

**UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER II SCIENCES ET TECHNIQUES
DU LANGUEDOC**

Année 2011 – N°

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER II

Discipline : Microbiologie/Parasitologie

**École Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences,
Hydrosciences et Environnements**

soutenue publiquement le 28 Octobre 2011

par

Elvina VIENNET

Insectes et maladies émergentes :

**Contacts hôte/*Culicoides* en région paléarctique et
leurs implications dans la transmission de la fièvre
catarrhale ovine**

JURY

M. Matthew BAYLIS	Professeur, Université de Liverpool, Royaume-Uni	Rapporteur
M. Willem TAKKEN	Professeur, Université de Wageningen, Pays-Bas	Rapporteur
M. Jean-Claude DELÉCOLLE	Chercheur, Université de Strasbourg	Examineur
M. Frédéric SIMARD	Directeur de Recherche, IRD, Montpellier	Président de jury
Mme. Catherine MOULIA	Directeur de Recherche, UM2, Montpellier	Directeur de thèse
M. Thierry BALDET	Chercheur, Cirad, Montpellier	Directeur de thèse

**UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER II SCIENCES ET TECHNIQUES
DU LANGUEDOC**

Année 2011 – N°

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER II

Discipline : Microbiologie/Parasitologie

**École Doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences,
Hydrosiences et Environnements**

soutenue publiquement le 28 Octobre 2011

par

Elvina VIENNET

Insectes et maladies émergentes :

**Contacts hôte/*Culicoides* en région paléarctique et
leurs implications dans la transmission de la fièvre
catarrhale ovine**

JURY

M. Matthew BAYLIS	Professeur, Université de Liverpool, Royaume-Uni	Rapporteur
M. Willem TAKKEN	Professeur, Université de Wageningen, Pays-Bas	Rapporteur
M. Jean-Claude DELÉCOLLE	Chercheur, Université de Strasbourg	Examineur
M. Frédéric SIMARD	Directeur de Recherche, IRD, Montpellier	Président de jury
Mme. Catherine MOULIA	Directeur de Recherche, UM2, Montpellier	Directeur de thèse
M. Thierry BALDET	Chercheur, Cirad, Montpellier	Directeur de thèse

Insectes et maladies émergentes : contacts hôte/*Culicoides* en région paléarctique et leurs implications dans la transmission de la fièvre catarrhale ovine

La découverte du rôle des insectes en tant que vecteurs de pathogènes, établi depuis plus d'un siècle, a été l'élément moteur de la discipline « entomologie médicale et vétérinaire ». Malgré le succès de nombreuses campagnes de prévention et de programmes de lutte, nous assistons depuis une trentaine d'années à l'émergence et à la recrudescence de maladies à transmission vectorielle. Le virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) (Reoviridae : *Orbivirus*) est un très bon exemple de virus émergent en Europe dont les mécanismes de transmission sont encore peu connus dans cette région. Ce virus est transmis par des moucheron hématophages du genre *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) aux ruminants sauvages et domestiques. En Europe, la FCO a été pendant longtemps considérée comme une maladie exotique. À partir de 1998, plusieurs incursions apparaissent dans l'ouest du bassin méditerranéen en lien avec la remontée vers le nord de populations de *Culicoides imicola*, le principal vecteur afrotropical. À partir d'août 2006, l'apparition et la transmission du sérotype 8 dans le nord de l'Europe, dans des zones où *C. imicola* est absent, révèle l'importance des espèces autochtones et la nécessité de comprendre leur rôle vecteur. Ce travail s'intéresse aux mécanismes de transmission du virus de la FCO en Europe non méditerranéenne, en i) présentant un état de l'art de la biologie et l'écologie des *Culicoides* adultes, ii) en évaluant les conditions possibles d'utilisation de pièges pour estimer le taux de piqure et iii) en décrivant les comportements trophiques pour les espèces d'intérêt vétérinaire.

Mots clés : *Culicoides*, fièvre catarrhale ovine, contact hôte/vecteur, comportement trophique, Europe

Insects and emerging diseases: host/*Culicoides* contact in the Palaearctic region and their implications in bluetongue transmission

The discovery of insects as pathogens vectors was established for over a century and was the driving force behind the discipline “medical and veterinary entomology”. Despite the success of some prevention and control program campaigns, the emergence and spread of vector-borne diseases occurred dramatically during this last thirty years. Bluetongue virus (BTV) (Reoviridae: *Orbivirus*) is a good example of emerging virus in Europe, with a little understanding of the epidemiology of this disease. This virus is transmitted by blood-sucking midges of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) to wild and domestic ruminants. In Europe, BT was considered an exotic disease. In 1998, several incursions appeared in the western Mediterranean Basin in line with the northward progression of *C. imicola* populations, the main afrotropical vector. From August 2006, the emergence and transmission of serotype 8 in northern Europe, in areas where *C. imicola* is absent, revealed the importance of autochthonous species and the urgent need to understand their role as vector. This work gives new insights into the understanding of BTV transmission in northern Europe: i) presenting a state of the art review of the biology and ecology of *Culicoides* adults, ii) assessing different methods to study the biting rate and iii) highlighting trends in host-seeking behavior.

Key words: *Culicoides*, bluetongue, host/vector contact, host-seeking behavior, Europe

Discipline: Microbiologie/Parasitologie

Intitulé et adresse du laboratoire de recherche

Cirad, UMR Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes
Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Remerciements

C'est l'histoire d'une aventure humaine en territoire de moucheron...

Ce travail de thèse est le fruit de 3 années d'études et de recherches au sein de l'unité Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes (CMAEE) du Cirad à Montpellier. Je remercie Dominique Martinez, directeur de l'UMR CMAEE, pour son accueil au sein de son unité.

Ce travail a été dirigé par Catherine Moulia (Université de Montpellier II) et Thierry Baldet (Cirad). Je tiens à remercier Catherine d'avoir accepté de diriger cette thèse, et de m'avoir prodigué toujours de très bons conseils et des remarques pertinentes. Je remercie Thierry qui, malgré son éloignement géographique, a toujours été réceptif, disponible et de bons conseils. Merci énormément pour ton soutien, ton aide précieuse et l'énergie que tu communique.

Ce travail n'aurait pas vu le jour et n'aurait pu aboutir sans l'excellent encadrement de Thomas Balenghien et Claire Garros de l'équipe « Vecteurs » de l'unité CMAEE du Cirad.

À Thomas, à qui je ne saurais, à vrai dire, exprimer suffisamment ma reconnaissance tellement elle est grande, profonde et risquerait d'être limitée par ces maigres mots. Il va de soi que de travailler et d'évoluer sous ton aile n'a été que bénéfique. Tu as su faire preuve d'une extrême patience (et il en a fallu), d'une très bonne pédagogie, de beaucoup de compréhension et de bienveillance qui, à mon avis, sont rares et vraiment très chères à mes yeux. Merci in-fi-ni-ment.

À Claire, personnalité au combien attachante et surprenante par son savoir. Tu as su me tirer un peu plus vers le haut, toujours à mon écoute, de conseils avisés et ce, dans la simplicité, gentillesse et jovialité. Merci infiniment pour ton soutien important. Un seul regret, ne pas avoir su aborder les bons moments avec suffisamment de détente...en espérant qu'il y en ait d'autres à l'avenir, bien sûr.

Je souhaite remercier Frédéric Simard d'avoir accepté de juger ce travail, et également les Professeurs Matthew Baylis (Université de Liverpool) et Willem Takken (Université de Wageningen) de me faire l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. I am honored that you have accepted to judge this work, deep thanks Pr. Matthew Baylis. Ik ben ontzettend dankbaar voor de inspirentie, ik heb veel van jullie geleerd. Danku veel Pr. Willem Takken.

À Jean-Claude Delécolle (Université Louis Pasteur de Strasbourg) qui a donné de son temps pour me former à l'identification des *Culicoides*, partager ses connaissances, ses anecdotes et ses bons tuyaux... merci, de m'avoir suivie pendant ces trois années mémorables. Ce ne fut que du bonheur et tellement appréciable d'apprendre d'un passionné que dis-je, d'un Maître. Merci également d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse.

Les expériences sur le terrain se sont déroulées à l'INRA de Nouzilly. Nous avons été accueillis par l'équipe UE 1277 Plateforme d'infectiologie Expérimentale (PFIE). Je tiens à adresser mes très sincères remerciements au directeur de l'unité PFIE Bertrand Schwartz et à son directeur adjoint Pierre Sarradin. Merci infiniment à Didier Crochet pour ses conseils, son aide sur le terrain, sa disponibilité et ses réponses à mes innombrables questions. Mes profonds remerciements vont aux animaliers de l'unité PFIE Sylvain Breton, Olivier Boulesteix, Thierry Chaumeil, Robert Gelineau, Edouard Guitton, Sébastien Lavilatte, Dany Leguere, Michel Maillon, Joel Moreau, Jeremy Pezant, Pascal Quinchamp, Maud Renouard et Mickaël Riou ; aux animaliers du service Equins Fabrice Reigner et Guy Duchamp à Laurent Foubert de l'atelier et à Michel (dit Mimi et sa belle faucheuse). Ce travail sur le terrain n'aurait pu se faire sans bricolages et tests au Cirad. Merci donc à l'équipe de la Ditam qui m'a gentiment accueillie, conseillée et aidée.

Je suis très reconnaissante aux membres de mon comité de thèse, Gérard Duvallet, Serge Morand et Vincent Robert qui ont su enrichir ce travail, apporter un regard critique, et partager leurs expériences tout au long de ces trois années.

C'est également une merveilleuse histoire de travail d'équipe. Je tiens à remercier infiniment Laëtiti Gardès pour son aide précieuse au laboratoire et sur le terrain. Mes sincères remerciements vont aux légendes arthuriennes, Xavier Allène, Ignace Rakotoarivony, Jonathan Lhoir et Roger Venail pour leur capacité à dompter avec brio et efficacité pince, loupe, cupules, aspirateur, perceuse, piste (de danse) et j'en passe... Merci d'avoir fait de cette aventure une légende. Merci à Ivanna Fuentes, très agréable, efficace au labo et tellement marrante, à Hélène Guis qui a toujours été de très bons conseils et d'une aide précieuse.

La larme à l'œil, je suis bien consciente de la chance que j'ai eu de pouvoir travailler à vos côtés, au sein de cette équipe si agréable, dynamique et bienveillante.

Merci à l'ensemble des personnes de l'UMR 15, aux collègues du bâtiment G de m'avoir intégrée en tant qu'entomo perdue dans un monde de virologistes, d'immunologistes et pour les bons moments partagés, même s'ils furent que très rares ces derniers mois. Merci à Nadège Cassese et Denise Bastron pour leurs disponibilités et efficacités. Merci à Renaud Lancelot pour les conseils et l'aide apportés au cours de ces trois années. Merci à ma collègue de bureau Samia Gendhouz d'avoir été aussi agréable et bienveillante surtout lors de ces derniers mois de rédaction. Merci à Saliha Hammoumi d'avoir été présente dans les bons comme dans les mauvais moments.

À Joëlle Lopez (secrétaire de l'école doctorale SIBAGHE) qui a toujours été souriante, accueillante et encourageante.

À mes parents et à mon frère évidemment, qui ont toujours été là pour m'épauler, m'encourager et m'aider à surmonter les nombreuses embûches. Un grand merci. Ça y est, vous pouvez souffler...

À pèpè, mèmè, leur sagesse, leur présence d'esprit et leur joie de vivre m'ont toujours émerveillée et sont sources inestimables d'énergie et de modestie. Me voici votre plus fidèle fan et je ne saurais comment vous remercier pour tous vos nombreux encouragements.

À ma petite mamie, son affection et sa bienveillance m'ont toujours réconfortée. Merci tellement pour tout ce que tu m'as apporté. Je pense très fort à toi, là où tu viens tout juste de partir.

Au reste de la famille qui m'a souvent encouragé.

À mes amis d'ici et à mes amis d'un là-bas cosmopolite, dont entre autres, Annabelle, Alexandra, Carole, Charlyne, Chris, Cindy, Fedor, Joost, Julia, Tom-tom, Marloes, Paula, Paulito, Pavel, Ulisses, Virginie. Merci pour votre soutien et tous les bons moments passés ensemble durant ces 3 années, même à distance et même s'ils furent trop rares, c'est bon de savoir que vous êtes là. À tous ceux que j'ai oublié, qu'ils m'en excusent...

À Carine. Et dire que nous avons échappé aux tensions de la vie en communauté. Trois ans dans le même bureau et deux années dans le même appartement et aucune (ou quasi aucune) crise...c'est beau...merci à toi, pour ton soutien et pour ton écoute salutaire. Bon séjour aux Etats-Unis et promis...un jour je te parlerai en brésilien.

À ces *Culicoides* qui m'ont nargué un soir d'été à quelques 16 000 km d'ici. Je les remercie d'avoir hanté et animé nombre de mes nuits et de m'avoir permis de rentrer dans la peau de ghostbuster...

Enfin à celui qui m'a rejointe en cours de route, toujours de bons conseils, réconfortants et d'une aide inestimable en période de rush. Pourvu que la route soit encore longue et belle. Merci à toi Samuel.

« Parmi ces êtres éphémères, se doivent voir des jeunesses d'un matin et des décrépitudes d'un jour. S'ils ont des histoires, ils ont des mois, des années, des siècles, des époques proportionnées à la durée d'une fleur. Ils ont une autre chronologie que la nôtre, comme ils ont une autre hydraulique et une autre optique. Ainsi, à mesure que l'homme s'approche des élémens de la nature, les principes de sa science s'évanouissent. Tels devoient donc être ma plante et ses habitans naturels aux yeux de mes mouchérons ; mais quand j'aurois pu acquérir, comme eux, une connoissance intime de ce nouveau monde, je n'en aurois pas encore eu l'histoire. »

***Etudes de la nature [Document électronique]. Tome I / par Jacques-Henri
Bernardin de Saint-Pierre (1737-1814).***

A papi,

Table des matières

Remerciements	i
Table des matières	vii
Table des illustrations : figures	x
Table des illustrations : tableaux	xii
Préambule	1
Introduction générale	5
Chapitre 1 : Revue des connaissances sur la biologie et l'écologie des <i>Culicoides</i> adultes et sur les méthodes de captures pour estimer le contact hôte/vecteur	
<i>Introduction en français</i>	17
<i>Review of the biology and ecology of adult Culicoides biting midges and of trapping methods to assess host/vector contact</i>	19
1. Introduction	20
2. Breeding sites and emergence	22
3. Swarming and mating	23
4. Flight range, dispersal and vertical activities	24
5. Host seeking behaviors	25
6. Circadian rhythm	29
7. Conclusions	29
<i>Discussion en français</i>	38
Chapitre 2 : Estimation du contact hôte/vecteur : Comparaison des pièges à appât et du piège à lumière ultraviolette pour la capture de <i>Culicoides</i> (Diptera : Ceratopogonidae), vecteurs d'Orbivirus	39
<i>Introduction en français</i>	41
<i>Assessment of vector/host contact: comparison of animal-baited traps and UV-light/suction trap for collecting Culicoides biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of Orbiviruses</i>	43
1. Background	43
2. Materials and methods	44
3. Results	46
4. Discussion	50
5. References	51
<i>Discussion en français</i>	55

Chapitre 3 : Préférences trophiques des espèces paléarctiques de <i>Culicoides</i>, potentiellement impliquées dans la transmission du virus de la fièvre catarrhale ovine en Europe	57
<i>Introduction en français</i>	59
<i>A. Host preferences of Palaearctic <i>Culicoides</i> biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): implications for Orbivirus transmission</i>	63
1. Introduction	65
2. Materials and methods	66
3. Results	69
4. Discussion	77
5. References	81
<i>B. Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in <i>Culicoides</i> (Ceratopogonidae: Diptera): applications on Palaearctic biting midge species, vectors of Orbiviruses</i>	85
1. Introduction	85
2. Materials and methods	86
3. Results	87
4. Discussion	87
5. References	88
<i>Discussion en français</i>	93
Chapitre 4 : Comportement trophique des vecteurs du virus de la FCO: endo/exophagie et rythme circadien des <i>Culicoides</i> paléarctiques du Nord-ouest de l'Europe	97
<i>Introduction en français</i>	99
<i>Host-seeking activity of bluetongue virus vectors: endo/exophagy and circadian rhythm of <i>Culicoides</i> in western Europe</i>	101
1. Introduction	103
2. Materials and methods	104
3. Results	107
4. Discussion	114
5. References	118
<i>Discussion en français</i>	123

Discussion générale	125
Conclusions générales et perspectives	137
Références bibliographiques	141

Tables des illustrations : figures

Chapitre 1 :

Figure 1. The worldwide distribution of Bluetongue virus (BTV) serotypes and the primary <i>Culicoides</i> vectors in different geographical regions denoting six predominant BTV episystems	21
Figure 2. Trophogonic cycle of the <i>Culicoides</i> vectors	22

Chapitre 2 :

Figure 1. Four collection methods compared during 12 days using a 4 x 4 Latin square design: (A) drop trap, (B) direct aspiration, (C) sticky cover trap and (D) UV-light/suction trap (OVI)	44
Figure 2. Sketch map of the study site (INRA) at Nouzilly (western France)	45
Figure 3. Graphical exploration of <i>C. brunnicans</i> female collections	49
Figure 4. Number of females (for the 8 most abundant species) collected by direct aspiration and with the sticky cover trap on each animal body part	51
Figure 5. Number of females (for the 5 most abundant species) collected by direct aspiration and with the drop trap each time period	52

Chapitre 3 A :

Figure 1. Sketch map of the study site at Nouzilly (western France) with the five hosts wearing sticky covers for comparison during 15 days following a 5 x 5 Latin square design.	67
Figure 2. Climatic conditions in the study site. (A) Ombrothermic diagram for comparison between 2009 and the 1971-2000 period (Météo France data) and (B) wind rose recorded during collection sessions.	70
Figure 3. Number of <i>Culicoides scoticus</i> , <i>C. dewulfi</i> and <i>C. obsoletus</i> females collected by host and by collection session.	73
Figure 4. Number of <i>Culicoides</i> females collected on each mare body part by collection session.	75
Figure 5. Probability of feeding twice on the same host species or successively on two different host species in various contexts of host abundances.	76
Figure 6. Correlation between the numbers of <i>Culicoides</i> females collected on mare and in the UV-light/suction trap.	77

Chapitre 3 B :

Figure 1. Localization of study sites and diversity of biting midge species collected at these study sites.	87
Figure 2. Species-specific PCR amplifications.	89
Figure 3. Species-specific PCR amplifications simulating multiple feedings.	89

Chapitre 4 :

Figure 1. Sketch map of the study site at Nouzilly (western France).	105
Figure 2. Climatic conditions in the study site.	107
Figure 3. Abundance of <i>Culicoides obsoletus</i> according to the trap and the location in spring (A), summer (B) and autumn (C). LOS: largely open stable.	111
Figure 4. Circadian host-seeking activity of <i>C. brunnicans</i> and <i>C. obsoletus</i> .	112
Figure 5. Number of <i>Culicoides</i> collected outdoor in host-baited traps compared to meteorological parameters recorded by MeteoFrance weather stations located at Parçay-Meslay or at Saunay.	113
Figure 6. Correlation between the numbers of <i>C. brunnicans</i> and <i>C. obsoletus</i> collected outdoor in host-baited traps and in UV-light/suction trap.	114

Table des illustrations : tableaux

Chapitre 2 :

Table 1. Numbers of *Culicoides* collected over 12 nights using four trapping methods. 48

Table 2. Observed and predicted biting rates per collection session. 50

Table 3. Observed and predicted parity rate per collection session. 50

Chapitre 3 A :

Table 1. Numbers of *Culicoides* collected over the 15 sessions on 5 different hosts using a sticky cover trap and the UV-light/suction trap. 72

Table 2. Observed and predicted numbers of *Culicoides* per host and per collection session. 74

Chapitre 3 B :

Table 1. Characteristics of the six farms where *Culicoides* were collecting from week 12 to 22 in 2009. 86

Table 2. Primer set used for identification of blood meal origin in *Culicoides* abdomen. 86

Table 3. Blood meal identifications of engorged *Culicoides*. 88

Chapitre 4 :

Table 1. Numbers of *Culicoides* collected over 18 sessions in spring, summer and autumn by host-baited traps and UV-light/suction trap. 109

Table 2. Mean No. observed (max) and predicted *Culicoides* or all species and the most abundant species depending on the trap, the location and the season. 110

Préambule

Ce manuscrit de thèse est structuré sous forme d'un enchaînement d'articles publiés en tant qu'auteur (**Chapitre 2**) et co-auteur (**Chapitre 3**), d'articles aboutis en cours de révision (**Chapitres 4 et 5**), et enfin d'un article qui nécessite d'être approfondi avant soumission (**Chapitre 1**). Afin de faciliter la lecture de ce manuscrit et de comprendre le cheminement logique de ce travail de recherche, une introduction, au début de chaque chapitre, permet de placer le contexte, de rappeler les objectifs et la stratégie employée. A la fin de chaque chapitre, une rapide discussion critique permet de rappeler les résultats, leurs intérêts et limites. Une discussion générale reprend les principaux résultats, les confronte aux connaissances actuelles sur la biologie et l'écologie des *Culicoides* et discute de l'implication de ce travail dans l'amélioration de la compréhension des mécanismes de transmission du virus de la FCO.

Introduction générale

Les insectes constituent une des formes de vie animale dominantes sur terre. Un million d'espèces sont actuellement décrites dans le monde (soit à peu près les deux tiers des espèces animales connues). Chez ce groupe, les phénomènes biologiques paraissent complexes et de nombreuses stratégies d'interaction avec leur biosphère existent allant du commensalisme au réel parasitisme (Waage, 1979). La grande majorité des insectes sont essentiels aux fonctions des écosystèmes. En effet, ils sont bénéfiques dans les cultures (décomposeurs, pollinisateurs, prédateurs d'espèces nuisibles) ou sources de nourriture pour les animaux et également pour de nombreuses populations humaines : consommation de chenilles et de termites en Afrique, de larves, de vers et d'escamoles en Amérique Latine, de larves et de nymphes de fourmis tisserandes, de libellules ou de sauterelles en Asie, ou encore de fourmis, de chenilles et de vers en Océanie, etc., certains pouvant être considérés essentiellement comme des friandises (Dufour, 1987 ; DeFoliart, 1989). Depuis plusieurs années, développer la consommation d'insectes comme substitut de poisson ou de viande fait partie d'un programme très sérieusement encouragé par les experts de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). En effet, dans le contexte de malnutrition grandissante, les qualités nutritionnelles des insectes (riche en fer, vitamines, acides aminés) ainsi que leur facilité d'élevage, permettraient d'assurer la sécurité alimentaire mondiale, des emplois et une source de revenu non négligeable dans les décennies à venir. Il a été estimé par exemple que, chaque année, 9,5 milliards de larves de mopane sont récoltées dans les forêts de Mopane d'Afrique du Sud pour une valeur de 85 millions de \$US, dont environ 40 % vont aux producteurs : principalement des femmes rurales pauvres. Les insectes sont également utilisés dans certaines médecines traditionnelles et dans la composition de médicaments (la cantharidine¹ (Barataud, 2004) ou la *Maggot therapy*² (Sherman and Pechter, 1988)), mais aussi en expertise médico-légale ou comme agents potentiels de lutte biologique (insectes parasitoïdes (Greany *et al.*, 1984)).

Contrairement aux idées reçues, moins de 0,5 % des espèces d'insectes sont des nuisibles (prédateurs, ravageurs, parasites ou hématophages). Ils peuvent être ravageurs pour les cultures. La mouche de Hesse (*Mayetiola destructor*) (Diptera : Cecidomyiidae) cause de sérieux dégâts au blé, orge, et seigle en Europe et en Amérique du Nord pouvant provoquer une perte annuelle de 20 millions de dollars sur la production de blé (Oman, 1968). Le criquet pèlerin, véritable fléau mondial, possède une aire d'invasion de plus de 29 millions de km², ce qui représente plus de 20 % des terres émergées. Ces criquets *Schistocerca gregaria* Foscål n'épargnent aucune culture et le coût des moyens engagés dans leur lutte est estimé à plus de 300 millions de dollar US. Les insectes peuvent aussi être pathogènes pour les vertébrés, en étant allergisants, urticants, vésicants, venimeux, ou hôtes d'agents pathogènes (transporteurs, hôtes intermédiaires, vecteurs) (Rhodain and Perez, 1985). Parmi ces insectes nuisibles pour les vertébrés, les insectes hématophages occupent une place toute particulière à cause des nuisances considérables qu'ils peuvent occasionner, mais surtout à cause des conséquences sanitaires des pathogènes qu'ils peuvent transmettre (Rhodain and Perez, 1985).

¹ Cantharidine : substance toxique extraite des coléoptères Cantharidés, remèdes contre les maux de poitrine

² Maggot therapy : asticothérapie ou larvotherapie, c'est-à-dire l'application de larves sur des plaies purulentes. Ces larves nettoient et aident à se cicatriser

L'hématophagie concernerait 14 000 espèces d'insectes appartenant à cinq ordres (Adams, 1999). Il s'agit d'une stratégie d'exploitation des ressources alimentaires tout à fait particulière, qui proviendrait d'une évolution des associations insecte/hôte vertébré (Balashov, 1984 ; Balashov, 1999). L'hématophagie pourrait ainsi être apparue suivant deux routes macro-évolutives distinctes (Waage, 1979). La première concernerait des insectes déjà en étroite association avec des vertébrés, comme, par exemple, ceux fréquentant les nids ou terriers – ces derniers assurant une protection intéressante par une atténuation des variations d'humidité et de température (Lehane, 2005) – ou les ectoparasites effectuant leur développement sur leur hôte (Waage, 1979; Balashov, 1999). Ces insectes, qui pouvaient se nourrir originellement de peau morte sur l'hôte, de sécrétions dermiques, etc., seraient devenus, dans un premier temps, occasionnellement hématophages puis hématophages facultatifs voire hématophages obligatoires (Waage, 1979). Cette évolution aurait été positivement sélectionnée, dans la mesure où le sang est plus digeste et plus nutritionnel que la peau et que ce comportement peut minimiser le temps et l'énergie dépensés dans la recherche de nourriture. L'autre voie évolutive concernerait des groupes d'insectes dont les pièces buccales étaient adaptées à la piqure (par exemple des végétaux), et chez qui serait apparu la capacité d'attaquer et de se gorger sur des vertébrés, notamment par le développement de leur capacité à trouver des hôtes (Waage, 1979; Balashov, 1999). La plupart des diptères hématophages appartiennent à cette catégorie. Quelque soit la voie évolutive, des adaptations morphologiques, physiologiques et comportementales communes sont apparues chez ces insectes pour réaliser leur hématophagie, à savoir : i) des adaptations aboutissant à des associations physiques régulières avec les hôtes incluant le comportement trophique, la préférence pour un habitat donné et les adaptations à la vie sur l'hôte et ii) des adaptations aboutissant à la capacité de se nourrir sur l'hôte, incluant la structure des pièces buccales, la capacité physiologique de digérer le sang et le comportement associé à l'initiation et la fin du repas.

L'hématophagie a des conséquences directes, qui peuvent être néfastes, sur les hôtes. Les piqures des insectes hématophages peuvent être douloureuses et provoquer des réactions allergiques locales intenses. Par exemple, en Ecosse, les piqures de *Culicoides impunctatus* Goetghebuer peuvent être tellement nombreuses et gênantes que toute activité à l'extérieur est difficile voire impossible sans protection, provoquant jusqu'à 20 % de perte pendant les horaires de travail dans les industries forestières en été (Hendry and Godwin, 1988). Lehane (Lehane, 2005) suggère que les populations des pays développés deviennent de plus en plus « intolérantes » aux insectes nuisibles. Plusieurs raisons implicites sont proposées : la sensibilisation grandissante à l'importance des insectes dans la transmission de maladie, la focalisation peut-être excessive autour de l'hygiène et de la propreté et l'urbanisation croissante qui fait des insectes une compagnie beaucoup plus rare que pour nos grands-parents vivant en zone rurale. La lutte contre cette nuisance, qui entraîne des coûts directs importants, peut s'avérer nécessaire pour le développement d'activités économiques, comme le tourisme, avec l'exemple de la démoustication continue du littoral méditerranéen français depuis les années 1960 ou encore celui de l'engagement contraint de certains pays du Sud dans des actions de contrôle pour satisfaire le développement des activités touristiques occidentales

(Lehane, 2005). De plus, le rôle nuisant associé aux spoliations sanguines peut entraîner des pertes sérieuses en agriculture.

Mais surtout, les insectes hématophages revêtent une importance de premier plan à cause des conséquences sanitaires, mais aussi économiques, des pathogènes qu'ils peuvent transmettre aux hommes et aux animaux. Les insectes ont été longtemps suspectés de jouer un rôle dans la transmission des maladies. Ainsi, les peuples d'Afrique de l'Est et de l'Ouest savent depuis longtemps que les mouches tsé-tsé sont impliquées dans la transmission de la maladie du sommeil chez les hommes et du Nagana chez les animaux (Lehane, 2005). En revanche, ce n'est qu'au 19^{ème} siècle, qu'on obtient la démonstration du rôle vecteur³ des insectes. En effet, en 1877, Sir Patrick Manson, en observant le développement des larves de la filaire *Wuchereria bancrofti* Cobbold chez *Culex pipiens fatigans* Wiedemann (ancien nom de *Culex quinquefasciatus* Say), ouvre la voie à une succession d'investigations, qui donne naissance à l'entomologie médicale et vétérinaire en tant que discipline autonome (Chernin, 1983; Rhodain and Perez, 1985). Ross en 1897 a été le premier à observer que les parasites du paludisme se développent au sein de moustiques. Deux années plus tard, en Italie, Grassi a fait le rapprochement entre la distribution géographique du moustique du genre *Anopheles* avec celle du paludisme (Nuttall *et al.*, 1901). Les systèmes vectoriels sont particulièrement intéressants pour étudier les interactions du vivant, dans la mesure où le pathogène peut être considéré comme un parasite (au sens large) du vecteur et de l'hôte, et que donc il existe, en parallèle de la coévolution hôte/insecte décrite précédemment, des coévolutions vertébrés/pathogène et vecteur/pathogène. Cette coévolution pathogène/vecteur a été mise en évidence, par exemple, dans le modèle *Culicoides*/hémospories en étudiant les relations entre haplotypes de parasites du genre *Haemoproteus* et de plusieurs espèces de vecteurs : *Culicoides festivipennis* Kieffer et *Culicoides kibunensis* Tokunaga (Martinez-de la Puente *et al.*, 2009). De même, certains parasites sont capables d'affecter le comportement trophique des vecteurs à leur profit afin d'accroître leur transmission (Moore, 1984 ; Moore, 1993 ; Grech *et al.*, 2006 ; Schaub, 2006 ; Otranto *et al.*, 2008). Par la suite, nous retiendrons comme définition de vecteur *un arthropode hématophage qui assure la transmission biologique (ou mécanique) active d'un agent infectieux d'un vertébré à un autre* (Rhodain and Perez, 1985). En cas de transmission biologique, une partie du cycle de développement de l'agent infectieux a lieu à l'intérieur du vecteur, alors que lors d'une transmission mécanique, le vecteur « transporte simplement » l'agent pathogène. Ces transmissions sont dites actives lorsque l'arthropode établit activement par son écologie le contact avec l'hôte vertébré.

L'agent pathogène, son vecteur et son hôte ont la capacité d'évoluer dans leurs environnements et de s'adapter aux contraintes pour survivre. De nombreuses causes peuvent modifier les interactions entre les acteurs de ce triptyque : changements climatiques et environnementaux, modifications économiques, démographiques et sociétales, décisions politiques notamment en santé publique, modification importante de la prévention à la réponse d'urgence, résistances aux traitements et insecticides, modifications génétiques des agents pathogènes. La modification des interactions peut provoquer la recrudescence ou l'émergence de maladies vectorielles. L'émergence d'une maladie infectieuse peut être décrite

³ Dans ce travail, nous employons 'vecteur' au sens entomologique du terme, défini par la suite. Un insecte vecteur peut-être également considéré en tant qu'« hôte vecteur », terme que nous simplifierons par « vecteur »

comme un procédé en deux étapes : i) l'introduction de l'agent pathogène dans une nouvelle population d'hôte ou nouvelle zone géographique suivie par ii) l'établissement de l'agent pathogène et sa propagation dans cette nouvelle population d'hôtes ou cette nouvelle zone géographique (Morse, 1995). L'introduction peut avoir lieu i) par l'arrivée d'un hôte vertébré infecté dans un nouvel environnement habité par un vecteur compétent ou ii) par l'arrivée d'un vecteur infecté compétent dans un nouvel environnement peuplé par des hôtes vertébrés sensibles (de La Rocque *et al.*, 2011).

A partir de la découverte du rôle des insectes dans la transmission de pathogènes (agent du paludisme, filaires lymphatiques, parasites de la maladie de Chagas, virus de la dengue, de la fièvre jaune ou de la fièvre *West Nile*, bacille pesteux, etc.), des campagnes de prévention et des programmes de lutte ont été menés, souvent avec succès, notamment à partir de la découverte des insecticides. Mais, depuis environ 30 ans, on assiste à la recrudescence et à l'émergence de maladies à transmission vectorielle. L'un des exemples récents les plus impressionnants est l'introduction en 1999 du virus de la fièvre *West Nile* – maladie à transmission vectorielle impliquant essentiellement des hôtes aviaires et des moustiques ornithophiles (principalement du genre *Culex*) – dans le district de New York, suivie de sa rapide propagation. Longtemps considéré comme un virus peu pathogène, il s'est imposé comme une menace sérieuse pour la santé humaine. L'origine du virus introduit en 1999 n'a toujours pas été élucidée. Cependant sa proximité avec la souche isolée en Israël en 1998 permet de suspecter une introduction depuis le Proche-Orient i) soit avec des oiseaux importés infectés ou ii) soit avec des moustiques importés infectés, la première hypothèse étant la plus probable (de La Rocque *et al.*, 2011). Entre 2001 et 2004, le virus de la fièvre *West Nile* s'est rapidement répandu à travers l'ensemble des Etats-Unis, les mouvements dispersifs et aléatoires des oiseaux résidents auraient été le principal mécanisme de cette dispersion, favorisée par la large distribution de *Culex tarsalis* Coquillett, un des vecteurs du virus dans la partie ouest des Etats-Unis (Venkatesan and Rasgon, 2010). Cet exemple illustre une émergence faisant suite à l'introduction d'une souche exotique, puis à sa transmission par des vecteurs autochtones. L'installation d'un vecteur exotique dans de nouvelles zones géographiques peut être un autre mécanisme d'émergence de pathogènes. Depuis 1970, *Aedes albopictus* (Skuse), originaire de l'Asie du Sud et vecteur des virus de la dengue et du chikungunya, s'est rapidement installé à travers le monde (Amériques, Europe, Afrique et Océanie) (Miller and Ballinger, 1988 ; Ward and Burgess, 1993 ; Lounibos, 2002 ; Simard *et al.*, 2005 ; Aranda *et al.*, 2006 ; Marini *et al.*, 2010). En France métropolitaine, depuis 2004, *Ae. albopictus* s'est durablement implanté dans le département des Alpes-Maritimes, puis dans les départements de Haute-Corse en 2006, de Corse-du-Sud et du Var en 2007, et des Bouches-du-Rhône en 2009. L'augmentation du commerce international et plus particulièrement les cargaisons de pneus usés est un des moyens de dispersion de cette espèce (Adhami and Reiter, 1998; Reiter, 1998). Cette espèce a été responsable, au cours de l'été 2010, de cas autochtones de dengue et de chikungunya sur le littoral méditerranéen français.

De nombreux facteurs peuvent expliquer la recrudescence de maladies à transmission vectorielle. En Camargue, ce sont des modifications anthropogéniques de l'écosystème rizicole (orientations politiques, stratégies de contrôle des ravageurs de culture, contraintes environnementales, amélioration des techniques de culture, facteurs sociaux) qui ont entraîné

d'importantes variations de l'abondance de *Culex modestus* Ficalbi, l'un des vecteurs du virus de la fièvre *West Nile*, au cours du XXe siècle, et qui pourraient avoir participé à la résurgence de cette maladie à partir de 2000 (Ponçon *et al.*, 2007). En Amérique du Sud, les facteurs responsables de la dramatique résurgence d'épidémies de dengue, en particulier dans sa forme hémorragique, sont complexes. Cependant, les principaux facteurs évoqués sont : i) une croissance importante de la population globale, associée à l'augmentation des voyages aériens, ii) une urbanisation incontrôlée avec une explosion d'habitations de mauvaise conception, surpeuplées, une détérioration de la qualité de l'eau et une mauvaise gestion des déchets aboutissant à une démultiplication du nombre d'habitats larvaires disponibles pour les vecteurs (principalement *Aedes aegypti* (L.)) et, iii) un manque de contrôle effectif des moustiques, avec le problème de l'apparition de résistances aux insecticides, dans les régions où la dengue est endémique (Gubler, 1989, 1998, 2005).

Le virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO, officiellement appelée fièvre catarrhale du mouton), appartenant au genre *Orbivirus* (Reoviridae), est un excellent exemple de virus émergent en Europe. Ce virus est transmis par des moucheron hémaphages du genre *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) (Du Toit, 1944). Cette maladie vectorielle est potentiellement mortelle chez les ovins, alors qu'elle s'exprime rarement ou sous des formes moins classiques chez les bovins, caprins et autres ruminants sauvages (à l'exception des ruminants sauvages états-uniens). L'infection n'entraîne pas les mêmes symptômes selon le pouvoir pathogène des sérotypes et la sensibilité des races ovines (Maclachlan and Gard, 2009).

Bien que la diversité des *Culicoides* soit importante avec un peu plus de 1 250 espèces décrites dans le monde appartenant à 36 sous-genres (Beckenbach and Borkent, 2003; Tabachnick, 2010), relativement peu d'espèces, approximativement une trentaine, sont impliquées en tant que vecteurs du virus de la FCO dans le monde (Meiswinkel *et al.*, 2004). La distribution du virus de la FCO est tributaire de la présence de vecteurs compétents, d'hôtes susceptibles et d'environnement approprié.

La fièvre catarrhale du mouton a été signalée pour la première fois en Afrique du Sud dans le *Report of the Cattle and Sheep Diseases Commission* de 1876. Ce signalement faisait suite à sa découverte chez des moutons de race Mérinos d'origine européenne introduits dans la colonie du Cap. La maladie était caractérisée par des inflammations aux niveaux des pieds et de la bouche (Henning, 1956 ; Maclachlan, 2011). Au total, 21 sérotypes parmi les 24⁴ existants sont présents en Afrique du Sud – les sérotypes 17, 20 et 21 étant exotiques (Gerdes, 2004). Au cours du XXe siècle, de nombreux sérotypes ont été découverts dans l'ensemble de l'Afrique, mais aussi dans de nombreux pays tropicaux et tempérés, notamment suite à l'évolution des techniques d'analyses virologiques et sérologiques. Le virus de la FCO a été isolé pour la première fois aux Etats-Unis en 1952 en Floride. Différents groupes de sérotypes ont par la suite été trouvés aux Amériques (1, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 17, 19, 22 en Amérique du nord, 1, 3, 4, 6, 8, 12, 17 en Amérique centrale et 4, 6, 12, 14, 17, 19, 20 en Amérique du sud). Deux systèmes épidémiologiques distincts semblent se maintenir avec *Culicoides sonorensis* Wirth, vecteur des sérotypes d'Amérique du nord et *Culicoides insignis*

⁴ Ces dernières années, plusieurs nouveaux serotypes ont été proposés

Lutz, vecteurs de ceux d'Amérique du sud (Walton, 2004). Le maintien de ces 2 systèmes est difficilement explicable et certainement dû à une combinaison d'interactions virus/vecteur/hôte, aux conditions environnementales et aux facteurs biotiques et abiotiques (Tabachnick, 2004). Au Pakistan, la FCO a été décrite pour la première fois en 1959 et en Inde en 1964. Depuis 5 sérotypes sont dénombrés au Pakistan et 21 en Inde.

Pendant longtemps, la FCO a été considérée en Europe comme une maladie exotique, (malgré quelques incursions au sud de l'Europe), jusqu'à ce que fin 1998, la FCO soit diagnostiquée dans plusieurs îles grecques (sérotipe 9) (Panagiotatos, 2004). D'autres incursions suivirent en 1999 (sérotypes 4 et 16) et 2001 (sérotipe 1). L'introduction de ces sérotypes est sans doute liée aux mouvements d'animaux le long de la « ceinture eurasiennne des ruminants » (une zone qui s'étend de l'Asie centrale à l'est du bassin méditerranéen, contribuant également à la propagation d'autres maladies comme la fièvre aphteuse, la peste des petits ruminants, la fièvre de la Vallée du Rift ou la variole ovine) (Slingenbergh *et al.*, 2004; Wilson and Mellor, 2009), et liée également à la dispersion passive par le vent de *Culicoides* infectés sur des grandes distances. Parallèlement, le sérotipe 2 apparaît en décembre 1999 au Maghreb. En 2000, de nouveaux cas ont été identifiés en Algérie, en France (Corse), en Espagne (Iles Baléares), en Grèce, en Sardaigne, en Sicile et en Tunisie. En 2001, la FCO s'est étendue au sud-ouest de l'Italie. En 2003-2004, le sérotipe 4 apparaît au Maroc, en Espagne et au Portugal (Gomez-Tejedor, 2004). En 2003, les sérotypes 4 et 16 sont identifiés en Sardaigne, puis peu de temps après en Corse. Ainsi, depuis 1998, 5 sérotypes circulent dans le bassin méditerranéen. A partir d'août 2006 dans le nord de l'Europe, la FCO prend une toute autre importance avec l'apparition du sérotipe 8, qui touche 5 états membres de l'Union européenne (Allemagne, Belgique, France, Luxembourg et Pays-Bas), puis s'étend en 2007 et 2008 à de nombreux pays d'Europe occidentale. Cette émergence a eu des conséquences sanitaires désastreuses dans la filière ovine et a engendré des problèmes économiques majeurs au sein des filières bovines freinant le commerce international d'animaux et de leurs produits. En parallèle, le sérotipe 1, identifié au Maghreb en 2006, s'est propagé à travers le nord pour toucher le Pays Basque espagnol et le Portugal en 2007 (Wilson and Mellor, 2009). L'année suivante, ce sérotipe a continué à s'étendre pour atteindre la Bretagne (un seul foyer). De manière plus anecdotique, un troisième sérotipe (sérotipe 6) a été identifié en octobre 2008 aux Pays-Bas, provoquant 23 foyers en Allemagne. L'utilisation illégale d'un vaccin atténué a, un temps, été évoquée pour expliquer son introduction, d'autant plus qu'un autre sérotipe (le 11) a été identifié en Belgique en janvier 2009, ce dernier étant lui aussi proche d'une souche vaccinale produite en Afrique du Sud (Wilson and Mellor, 2009).

Les zones nouvellement touchées par le virus de la FCO dans l'ouest du bassin méditerranéen coïncident avec des zones nouvellement colonisées (dans certains cas certainement déjà peuplées) par les populations de *Culicoides imicola* Kieffer (Mellor *et al.*, 2008) à savoir les îles Baléares (Miranda *et al.*, 2003), la Corse (Delécolle, 2002), la Sicile, la Sardaigne, ou certaines zones de l'Italie continentale (Conte *et al.*, 2003; Goffredo *et al.*, 2004; Torina *et al.*, 2004). De plus, cette espèce a été mise en évidence dans le Var, d'abord des individus erratiques puis des populations installées à partir de 2004. Avec la remontée de *C. imicola* vers le nord probablement suite à l'augmentation globale des températures (Purse

and Rogers, 2009), la « ligne-*C. imicola* » (Tabachnick, 2004) délimite deux systèmes épidémiologiques. Au sud de cette ligne, les foyers de FCO sont liés à l'introduction de différents sérotypes à partir de la Turquie ou du Maghreb suivant trois routes principales (Maroc/Espagne, Tunisie/Sicile, Turquie/Grèce et Bulgarie) suite aux mouvements d'animaux ou à la dispersion par les vents de moucheron infectés. Dans de nombreuses zones, en particulier dans l'ouest du bassin méditerranéen, c'est *C. imicola* qui est considéré comme le vecteur principal. Au nord de cette ligne, dans les zones où *C. imicola* est absent, ce sont des espèces autochtones qui ont été les vecteurs du sérotype 8. Récemment, Guis *et al.* (2011) ont suggéré que l'augmentation globale des températures s'est accompagnée de l'accroissement du risque de transmission du virus de la FCO dans le nord de l'Europe.

Au nord de la « ligne-*C. imicola* », les vecteurs avérés du virus de la FCO n'ont toujours pas été rigoureusement identifiés. Pour qu'un arthropode hématophage soit incriminé en tant que vecteur, il faut qu'il réponde à plusieurs critères : i) piquer les hôtes impliqués dans les cycles de transmission et être présent pendant les périodes de circulation virale, ii) héberger le virus en conditions naturelles, c'est-à-dire que l'on doit pouvoir isoler le virus chez des individus capturés sur le terrain, iii) s'infecter en se gorgeant sur un hôte virémique ou sur un substitut artificiel et iv) être apte à amplifier et transmettre le virus par piqûre (Organisation Mondiale de la Santé, 1967). Quelques études se sont intéressées à la compétence vectorielle (aptitude intrinsèque d'une population de vecteur à s'infecter et à transmettre l'agent pathogène) des *Culicoides* de la région paléarctique vis-à-vis des sérotypes transmis en Europe (Carpenter *et al.*, 2006; Carpenter *et al.*, 2008). Elles restent peu nombreuses à cause des difficultés méthodologiques, aboutissant à de faibles taux de gorgement, compliquées par de faibles taux d'infection. Les deux espèces du Complexe Obsoletus, *Culicoides obsoletus* (Meigen) et *Culicoides scoticus* Downes and Kettle, sont capables de s'infecter avec les sérotypes 8 et 9 (Carpenter *et al.*, 2006; Carpenter *et al.*, 2008). Les faibles taux d'infection observés pourraient être la conséquence de la méthode de gorgement dans cette étude (Venter *et al.*, 2005; Carpenter *et al.*, 2006). La recherche de virus chez des *Culicoides* capturés sur le terrain a été menée dans différents pays (Caracappa *et al.*, 2003 ; Savini *et al.*, 2005; Meiswinkel *et al.*, 2007; Dijkstra *et al.*, 2008; Hoffmann *et al.*, 2009 ; Vanbinst *et al.*, 2009). Du virus a été identifié chez des individus du Complexe Obsoletus, chez *Culicoides chiopterus* (Meigen) et *Culicoides dewulfi* Goetghebuer, toutes ces espèces appartenant au sous-genre *Avaritia*, mais aussi chez *Culicoides pulicaris* (Linnaeus). Des données sont disponibles sur la distribution et la dynamique de population des espèces de *Culicoides* (Torina *et al.*, 2004; Purse *et al.*, 2006; Takken *et al.*, 2008). Elles proviennent essentiellement de captures réalisées, à différentes échelles spatiales et temporelles, à l'aide de pièges lumineux, en particulier suite à la généralisation des systèmes de surveillance en Europe. Or, ces méthodes de capture ne représentent pas correctement la diversité et l'abondance des *Culicoides* entrant en contact avec les hôtes (Carpenter *et al.*, 2008; Gerry *et al.*, 2009), information pourtant essentielle pour déterminer les espèces vectrices et pour évaluer le risque de transmission.

Problématique

Comme nous venons de le voir, la biologie et l'écologie des espèces vectrices de *Culicoides*, conditionnent en grande partie la transmission du virus de la FCO. Nous nous intéressons à la relation entre l'hôte et les espèces paléarctiques, et à leurs conséquences dans la transmission du virus de la FCO en région tempérée.

Les enjeux de ce travail de thèse sont triples. Tout d'abord, il répond à un enjeu scientifique qui est la compréhension de l'association entre insectes hématophages et hôte vertébré, en prenant pour modèle la relation hôte/vecteur responsable de la transmission du virus de la FCO. Ce modèle est particulièrement intéressant dans la mesure où il s'agit d'un exemple de maladie à transmission vectorielle émergente en Europe avec deux mécanismes distincts : i) la remontée vers le nord d'un vecteur exotique et ii) la transmission de virus exotiques par des vecteurs autochtones. C'est aussi un des seuls exemples où l'augmentation globale des températures semble directement responsable de l'émergence de cette maladie vectorielle. La compréhension de ce modèle complexe permet également de mieux appréhender les autres maladies vectorielles, dont le pathogène est transmis par les *Culicoides*, comme la peste équine ayant pour hôtes les chevaux (Mellor *et al.*, 1990) et la maladie épidémiologique hémorragique des cervidés (EHD) (Gerbier *et al.*, 2011).

D'autre part, ce travail peut avoir des implications dans la lutte et dans la surveillance puisqu'il peut permettre, en alimentant les connaissances sur les vecteurs potentiels, de proposer des mesures de prévention, des stratégies de lutte anti-vectorielle et une optimisation de la surveillance.

Enfin, l'étude des *Culicoides*, et plus particulièrement l'étude de leur contact avec l'hôte (paramètre rentrant dans la caractérisation de la transmission), a nécessité l'utilisation et le développement d'outils adaptés aux difficultés du modèle offrant, ainsi, un formidable défi méthodologique.

Objectif général

Ce travail de thèse tend à **améliorer les connaissances sur la biologie et l'écologie des espèces de *Culicoides* suspectées vectrices du virus de la FCO en caractérisant le comportement trophique.**

Stratégies, objectifs spécifiques et structure de la thèse

L'aspect récent de l'intérêt suscité par les *Culicoides* en région paléarctique explique le faible nombre d'articles de synthèse et le manque de standardisation entre les différentes études sur l'écologie des espèces d'intérêt pour cette région. Afin de combler ce manque, une revue de l'état de l'art sur la biologie et l'écologie des *Culicoides* adultes rassemble les

connaissances actuelles, en essayant d'identifier les lacunes et les pistes de recherche à explorer (**chapitre 1**).

L'étude du comportement trophique des *Culicoides* nécessite des captures sur appât, méthode directe la moins biaisée pour étudier la diversité et mesurer l'abondance des insectes qui viennent au contact de l'hôte pour se gorger (Carpenter *et al.*, 2008). Pour comprendre la représentativité du nombre de *Culicoides* venant se gorger sur animal, c'est-à-dire le taux de piqûre, il a fallu tout d'abord comparer les pièges utilisés pour étudier le contact hôte/vecteur. A l'aide d'une méthode standardisée (méthode des carrés latin), deux méthodes classiques de capture sur appât (le *drop trap* et l'aspiration directe) ont été comparées entre elles, à un piège à appât développé pour cette étude et à un piège lumineux communément utilisé dans de nombreuses études ou actions de surveillance. Il s'agit d'appréhender les possibles biais de chaque piège (**chapitre 2**). Notre premier objectif spécifique est de comparer les estimations du taux de piqûre des espèces de *Culicoides* par chacun des systèmes de piégeage pour déterminer les conditions possibles d'utilisation de ces pièges.

Le choix de l'hôte par les insectes hématophages est un facteur crucial qui détermine l'intensité de la transmission des pathogènes. La spécialisation alimentaire est le résultat évolutif d'un compromis entre le bénéfice d'attendre un hôte approprié et le risque de mourir avant d'avoir pu se gorger dessus, aboutissant à des comportements spécialisés ou opportunistes (Lyimo, 2009). Théoriquement, un comportement opportuniste doit être sélectionné dans un environnement où la probabilité de rencontre avec l'hôte est faible, alors qu'un comportement spécifique doit être sélectionné dans un environnement avec un large choix d'hôtes appropriés. Ces comportements trophiques dépendent de la disponibilité en hôtes, mais également de leurs comportements de défense face aux piqûres (Kettle, 1962 ; Kay *et al.*, 1979 ; Blackwell *et al.*, 1994). Notre second objectif spécifique est de caractériser les préférences trophiques des espèces paléarctiques de *Culicoides*. Dans un premier temps, nous avons utilisé une méthode directe, comparant l'attractivité de cinq espèces d'hôtes différentes en utilisant un protocole standardisé en carré latin. Le choix de l'hôte est influencé par différents facteurs externes à l'insecte, qu'ils soient propres à l'hôte (taille, poids, surface corporelle, couleur, odeur) ou propres à l'environnement (présence d'autres animaux environnants, conditions climatiques) et donc peut être dépendant de la localité. L'étude des préférences trophiques à une large échelle par des méthodes directes (pièges sur appât) est limitée pour des raisons logistiques et pratiques. Ainsi, afin d'avoir une représentation des préférences trophiques sur une large échelle, cette approche expérimentale a été complétée par le développement et la validation d'un outil moléculaire d'identification de l'origine des repas de sang à partir d'une PCR multiplexée espèce-spécifique. Cette méthode a été appliquée à des femelles gorgées capturées sur différents sites en France (5 fermes réparties entre les Pyrénées-Atlantiques et l'Ille-et-Vilaine) (**chapitre 3**).

Chez toutes les espèces animales, il existe une adaptation de nombreuses fonctions internes aux cycles externes de l'environnement. Ces rythmes ont une périodicité d'environ 24 heures, sont sous dépendance de mécanismes endogènes appelés système circadien et

entraînent des variations comportementales et physiologiques (Tomioka and Sakamoto, 2006). Chez les insectes, cela peut se manifester par des changements de comportement (activité de déplacement) ou des variations de sensibilité aux stimuli visuels ou olfactifs (Corbet, 1966). Le rôle le plus important du système circadien est de programmer les phénomènes physiologiques et comportementaux de l'insecte à un moment opportun (anticipation des différents moments de la journée et des changements de saison pour optimiser l'activité de vol, d'accouplement, de recherche d'hôte, de gîte de ponte). On peut supposer que les heures d'activité de recherche d'hôtes sont sélectionnées pour maximiser le succès du repas sanguin, c'est-à-dire aboutir à une activité au moment où les hôtes sont disponibles et minimiser la mortalité au moment de ces déplacements. De même, l'endophagie, c'est-à-dire la capacité des insectes à pénétrer dans les bâtiments pour piquer leurs hôtes, est une adaptation pour rencontrer leurs hôtes. Notre troisième objectif spécifique est d'analyser l'activité journalière des *Culicoides* et leur capacité à entrer dans un bâtiment pour se gorger. Pour cela, des captures sur appât ont été effectuées au cours de trois saisons (printemps, été, automne) et sur trois niveaux d'ouvertures de bâtiment (barrière physique) (**chapitre 4**).

Par ailleurs, les captures sur appât réalisées pour ces différents objectifs ont permis de faire l'inventaire des espèces de *Culicoides* piquant les hôtes d'intérêts, déterminer leurs sites de pique sur l'animal et de comparer les abondances obtenues par piégeage lumineux et les taux de pique obtenus avec les pièges à appât (**chapitre 2, 3 et 4**).

Enfin, une **discussion générale** a permis de mettre en perspective les résultats de ces travaux par rapport aux connaissances actuelles sur la biologie et l'écologie des *Culicoides* et sur celle d'autres vecteurs et de discuter dans quelle mesure ils apportent des réponses sur les mécanismes de la transmission du virus de la FCO et des pistes pour la prévention de cette dernière.

Chapitre 1 :

**Revue des connaissances sur la biologie et l'écologie
des *Culicoides* adultes et sur les méthodes de capture
pour estimer le contact hôte/vecteur**

Introduction au chapitre 1

La première description de *Culicoides* a été publiée par le révérend William Derham en 1713 (Reye and Lee, 1963; Mellor *et al.*, 2000). Longtemps appelés « sandflies » pour leur fréquente présence sur les plages ou pendant les parties de pêche, les *Culicoides* vont être reconnus d'abord comme des insectes nuisibles, puis comme des vecteurs de virus et filaires. Au 20^e siècle, ces insectes sont étudiés principalement aux Etats-Unis pour leur nuisance et en Afrique du Sud et Australie à cause de leur rôle dans la transmission des virus de la peste équine et de la fièvre catarrhale du mouton. La biologie et l'écologie des espèces européennes ont cependant suscité l'intérêt de peu d'équipes. En France, Callot, Kremer et Delécolle ont, pendant leur carrière, développé et entretenu une collection muséologique impressionnante de nombreuses espèces de Ceratopogonidae et plus particulièrement de *Culicoides*.

Dès l'apparition du virus de la FCO dans le bassin méditerranéen à la fin des années 1990, des systèmes de surveillance de l'activité des populations de *Culicoides* se mettent en place dans le sud de l'Europe. Ils ciblent principalement *C. imicola*, vecteur avéré du virus de la FCO. A partir de 2006, l'émergence et la rapide diffusion du virus de la FCO en Europe placent les *Culicoides* sous les projecteurs. En réponse à une exigence réglementaire communautaire, de nombreux réseaux de surveillance se mettent en place en Europe, qui se heurtent au manque d'expertise dans l'identification des *Culicoides* – peu de pays ayant des experts reconnus dans le domaine. En effet, l'identification des *Culicoides*, caractérisés par leur petite taille et par une grande diversité spécifique encore mal définie, demande beaucoup de temps et d'expérience malgré l'existence de clés d'identification dichotomiques (Campbell and Pelham-Clinton, 1960; Delécolle, 1985). En parallèle à la mise en place de ces réseaux, de nombreuses études se mettent en place pour essayer de pallier le manque de connaissance sur la biologie et l'écologie de ce groupe d'insectes.

Peu de travaux de synthèse ont été publiés sur la biologie et l'écologie des espèces de *Culicoides*, qu'ils soient nuisibles ou vecteurs avérés, à l'exception de la revue de Kettle (1962) qui porte sur l'écologie et le contrôle des genres *Culicoides* et *Leptoconops*. Ce chapitre se propose de faire une revue de la littérature, pour mettre en exergue les parties de la biologie et l'écologie des *Culicoides* au stade adulte qui restent peu ou mal décrites, de manière à dégager des axes de recherche. Ce chapitre a vocation à être soumis pour publication. Néanmoins, il n'est pas dans une version aboutie et doit être considéré comme une version préliminaire.

Review of the biology and ecology of adult *Culicoides* biting midges and of trapping methods to assess host/vector contact

E. Viennet¹*et al.*

¹ CIRAD, UMR Contrôle des maladies, F-34398 Montpellier, France

Corresponding authors:

* Cirad, Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes, Campus International de Baillarguet, TA-A15/A, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Phone: + 33-(0)4 67 59 38 56; elvina.viennet@cirad.fr or thomas.balenghien@cirad.fr

Introduction

Observations of the clinical signs of bluetongue disease were first recorded from Merino sheep imported from Europe into what was then the South African Cape Colony in the early 20th century, although anecdotal reports of the disease pre-dated this report (see review in Mellor *et al.* (2000); Mellor (2004)). Circumstantial evidence suggested that bluetongue disease was carried by an insect: bluetongue disease was most prevalent during the late summer months following wet seasons, when insects multiplied rapidly, and no disease outbreaks were observed after the first heavy frosts, sheep stabled in sheds during summer night were less infected, and disease were more present in low lands than at higher altitude. Mosquitoes were initially incriminated as the most likely vectors. After an exhaustive search for a natural agent of transmission, du Toit (1944) proved the role of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in bluetongue virus transmission, through the injection of homogenized, field-collected midge emulsions and a preliminary transmission experiment between sheep using *Culicoides imicola* Kieffer. Latterly Hardy and Price (1952) confirmed that *Culicoides variipennis* (Coquillett) was also involved in bluetongue transmission in the United States. Meanwhile, biting midges were recognized as main nuisance in several coastal areas of the United States where they were responsible for limitation for land development and tourism activities. Since their implication as bluetongue vectors, field and laboratory studies were implemented in different countries to understand the biology and ecology of *Culicoides*, vector competence, and epidemiology of others *Culicoides*-borne diseases to implement adequate vector control strategies. These studies concerned bovine and equine onchocerciasis in the United States (Collins and Jones, 1978; Cummings and James, 1985) Australia (Ottley *et al.*, 1983), United Kingdom (McCall and Trees, 1993), livestock hypersensitivity and horse sweet itch in Israel (Braverman *et al.*, 1983; Yeruham *et al.*, 1993).

More than 1300 *Culicoides* species are known worldwide with the exception of Antarctica and New Zealand (Borkent, 2011). Certain species are a biting nuisance to humans, cause an acute allergic dermatitis in horses and are incriminated as virus and filarial worms vectors in all biogeographical regions. *Culicoides*-borne diseases of international significance for animal health are bluetongue and other related *Orbivirus* diseases, African horse sickness, epizootic of hemorrhagic disease. African horse sickness has been periodically recorded beyond its traditional enzootic range in subsaharian Africa, with unexpected incursions into southern Europe (Spain and Portugal) as in 1987, through zebra introductions. Until 1980, Europe was considered free of bluetongue, thus considered as an exotic disease. Occasional incursions of bluetongue virus were observed into Spain, Portugal and Turkey, apparently related to *Culicoides* (mostly *C. imicola*) originating from North Africa or Middle East passively moved by winds. Early in 1998, *C. imicola* spread into new territories in the Mediterranean basin and coincidentally bluetongue strains became established following two main routes. Epidemiological situation changed drastically in august 2006 when serotype 8 invaded central and northern Europe, areas known to be out of *C. imicola* distribution. Although the origin and route of introduction are still hypothesized, it clearly appeared that the Palaearctic autochthonous biting midges were responsible for bluetongue transmission (Fig. 1).

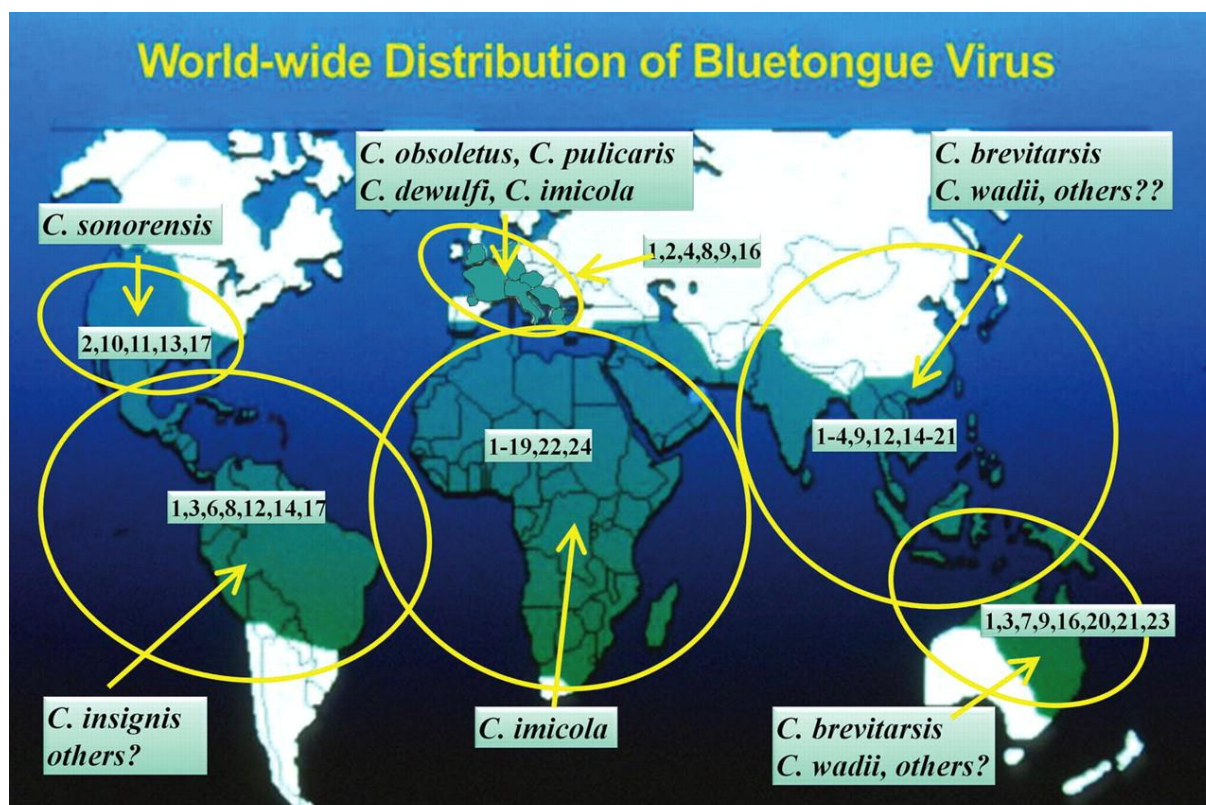


Figure 1. The worldwide distribution of Bluetongue virus (BTV) serotypes and the primary *Culicoides* vectors in different geographical regions denoting six predominant BTV episystems [in Tabachnick, W. J. 2009, Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease episystems in a changing world. *J. Exp. Biol.* 213, 946-954, modified from Tabachnick (2004)].

The spread of bluetongue in western and northern Europe leads to a serious sanitary crisis with important economic losses.

The epidemiological changes in bluetongue and African horse sickness virus transmission in the last decade and the potential risk of transmission into new territories in a next future highlighted the urgent need for a better understanding of adult biting midge bionomics and ecology, especially in new transmission areas such as the Palaearctic region. However, methodological difficulties or bias in biting midge collections, the failure to establish colonies as well as the taxonomic imbroglio hampered the understanding of biting midge biology and ecology. The description and assessment of adult biological parameters is fundamental for epidemiological models and to evaluate vector control measures and strategies. This review aims at describing the current available knowledge on adult *Culicoides* biology and ecology and discussing why certain areas have received little attention and suggesting strategies or experimentations that could aid future risk assessment and intervention.

Female *Culicoides* as haematophagous dipteran feed on blood, to provide proteins and nitrogen for the maturation and development of the eggs. Throughout the female biting midge's life, a succession of three successive biological phases (Beklemishev phases) occurs before and after the blood meal: (i) the search for a host and blood-feeding, (ii) digestion of the blood and egg maturation, and (iii) the search for a suitable oviposition site and

oviposition. The gonotrophic cycle duration may then be defined as the time interval between two consecutive blood-meals (or the time interval between two consecutive acts of egg-laying) (Fig. 2). Only two species are known to be parthenogenetic⁵ and autogenous⁶, respectively *Culicoides bambusicola* Lutz and *Culicoides bermudensis* Williams. In this cyclic mode of reproduction the biting rate is determined by the length of the gonotrophic cycle (i.e. one bite with a complete blood meal per cycle). The measurement of the biting rate and reliable estimates of biological trends are important parameter in transmission models and in formulas such as the vectorial capacity, which predict the vector's pathogen-transmitting potential, but also to establish appropriate vector control measures.

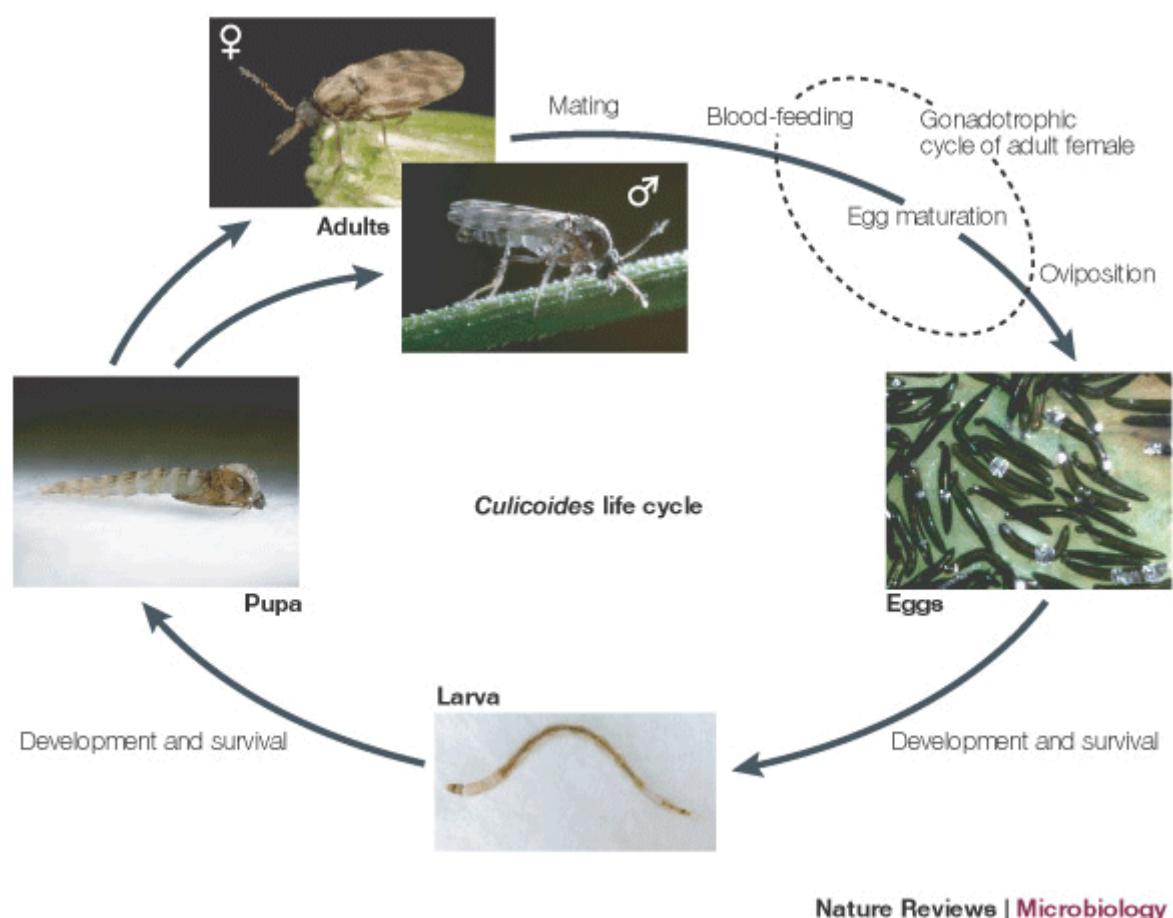


Figure 2. Trophogonic cycle of the *Culicoides* vectors. From Purse *et al.* 2005 *Nature Reviews Microbiology* **3**, 171-181

Breeding sites and adult emergence

For a huge majority of *Culicoides* species, larval habitats are not described and are largely unknown. Therefore, few data on emergence and emergence frequency are described

⁵ Parthenogenetic: derived from the word "parthenogenesis", comes from the Greek παρθένος, *parthenos*, meaning "virgin", and γένεσις, *genesis*, meaning "birth". A form of asexual reproduction found in females, where growth and development of embryos occurs without fertilization by a male

⁶ Autogenous: self-generated or self-generating

in the literature. Ideally, emerging/emergence traps placed over larval habitats will be used to assess sex ratio, emerging frequency and time. Generally, males emerge slightly earlier than females. In northeastern Colorado, Barnard and Jones (1980) studied the diel emergence patterns of *C. variipennis* using an emergence trap designed by Bildingmayer (1961), Davies (1966) and modified by Braverman (1970). Adult emergence exhibited bimodal diel pattern with one principal peak just after sunset and a second peak three to five hours after the sunrise. Males and females emerged in equal numbers at the first peak whereas at the second peak, more males emerged than females. Long term field investigations on *Culicoides furens* (Poey) in Florida compared seasonal emergence in three different habitats (tidal ditches, impoundments, and brackish pools) using emergence traps. Light traps were also used. Emergence from brackish pools and tidal ditches was observed early March to early June with a maximum in May, with a clear decrease during the cold months (from October till March). The emergence pattern from impoundments was a lower peak of emergence later in the summer, with a continuation of adult emergence throughout the summer. Authors highlighted the importance of water temperature, soil temperature and composition. Seasonal emergence dynamics followed by light traps were different from the data obtained with the emergence traps. These findings are sufficient for Linley et al. (1970) to justify the assessment that light traps provide an incomplete representation of the seasonal emergence. Emergences of *Culicoides obsoletus* (Meigen) in France from soil samples collected outside and inside two holdings were recently observed (Ninio *et al.*, 2011). In one holding, *C. obsoletus* midges emerged from used litter collected inside a dairy cow building and from manure left outside the farm buildings. In the second holding, the number of emergences observed was much lower, especially for indoor samples. Authors highlighted the impact of farming practices on the abundance of emergence. Larval ecology of biting midges is a neglected research area principally because of the microscopic size of larvae and pupae resulting in time-consuming and difficult morphological identification step. Understanding and estimates of biological parameters linked to emergence would be better access when larval ecology and description of larval habitats for the species of veterinary interest will be addressed.

Swarming and mating

Male swarms occur in many species of *Culicoides* and are always near the habitat from which they have emerged, close to a species-specific swarm-marker (tree branch, dark rock). Occasionally, male flying alone might search for a female. It is possible that some species does not form mating swarms such as *Culicoides melleus* (Coquillett) (Linley and Adams, 1972). *Culicoides* females often fly through male swarm and are recognized by the wing beat frequency and the secretion of pheromones. They can mate rapidly during the flight (Downes, 1955), on a substrate (Downes, 1955), or without flying while the female is feeding on host, as *Culicoides nubeculosus* (Meigen) (Downes, 1950; Kettle, 1962). The flight pattern was observed as mostly backward-and-forward, side-to-side and up-and-down movements. Swarming behavior was studied to distinguish among members of species complex as it can act as a reproductive isolation mechanism among closely related species. Downes (1978)

suggested that *Culicoides occidentalis* Wirth and Jones, a western form of the *C. variipennis* complex, is a facultative swarmer whereas *C. variipennis*, an eastern form, is an obligate swarmer, considering therefore two different taxonomic entities. Zimmerman (1982) found that a pairing occurred every 10 to 15s with 120 to 360 matings/swarm. *Culicoides brevitarsis* Kieffer formed swarms in the presence or absence of host, but the presence of host increased the swarm size being an attraction cue for females, and decreased the distance between swarm and cattle (Campbell and Kettle, 1979). *Culicoides brevitarsis* swarms have been observed mostly 1 hour before sunset and stop at or soon after sunset. Humidity, temperature, cloud cover and the presence of direct sunlight did not influence the probability that swarms form. A better understanding of swarming and mating behavior of natural populations could help for the set up and maintenance of lab colonies and control.

Flight range, dispersal and vertical activities

Flight distances of *Culicoides* recorded vary from only a few hundred meters (Kettle, 1951; Lillie *et al.*, 1981; Murray, 1987) to several kilometers (Kettle, 1960; Sellers, 1980; Murray and Kirkland, 1995) although cues and physiological limitations that restrict range are poorly understood, and biting midges are recognized as bad active flyers. Studies of long-distance dispersal are usually inferred from incursions of *Culicoides*-borne pathogens onto islands and across large stretches of water in the absence of animal movement as in Australia (Johansen *et al.*, 2003), and in southern Europe (Capela *et al.* 2003; Torina *et al.* 2004). Many insects use the fast moving nocturnal, low-level jet stream at the top of the atmospheric boundary layer to assist long-distance migration (Chapman *et al.*, 2004; Reynolds *et al.*, 2008), and individual *Culicoides* have been caught at heights of several hundred metres (Glick, 1939; Hardy and Cheng, 1986; Johansen *et al.*, 2003; Sanders *et al.*, 2011). *Culicoides* are sensitive to desiccation and have low self-propelled flight speeds in comparison with many other vector groups. Appetitive flight is governed by temperature, humidity, and light intensity thresholds and appears to be inhibited by wind speeds >3 m/s. Walker *et al.* (1977) observed that the activity of *C. imicola* and *Culicoides schultzei* (Enderlein) species group was inhibited when wind speed exceeded 3 m/s, and 2.2 m/s in Australia for *C. brevitarsis* (Murray, 1987). Suitable estimated climatic conditions for the survival of *Culicoides* in Israel are at temperature from 15 to 35 °C, a relative humidity above 25% and wind velocity up to 35 km/h at a suitable altitude of 1 km (Braverman and Chechik, 1996). In the lab, the flight behavior and activities of two Oriental species, *Culicoides oxystoma* Kieffer and *Culicoides pictipennis* (Staeger) (originally called *Culicoides maculatus*) was particularly influenced by temperature, with optimum in the range between 10°C and 20°C, while the activities under 10°C were very limited for both species. Purse *et al.* (2005) reported that recruitment to the adult population of *C. imicola* is inhibited below a threshold temperature of about 8–10°C. The optimal method to access flight range is capture-mark-release experimentations. This is feasible when a large number of individuals can be breed from laboratories colonies or collected alive from field collections. To date, few capture-mark-release studies of *Culicoides* biting midges are published. Different methods have been deployed to study the vertical distribution of biting midges including air-planes (Glick, 1939), bird-baited traps (Hadow

and Dick, 1948), sticky traps (Kettle, 1951), truck-trap (Murray, 1987; Johansen *et al.*, 2003), light-traps (Murray, 1987; Bishop *et al.*, 2000), and balloon net traps (Johansen *et al.*, 2003). All these studies show that *Culicoides* species occurred at high altitude, even if occasional, with a biased sex ratio towards male.

Host-seeking behaviors

Visual stimuli and odor attractants role

Visual stimuli and body odors mediate the attraction of hematophagous diptera to their hosts (Bishop *et al.*, 2008). *Culicoides* species certainly use the maxillary palps and the antennae as main olfactory structures for resource location (Blackwell *et al.*, 1992). Unfortunately, responses to chemicals are less clear for *Culicoides* species than for mosquitoes. Visibility of the animal can be a determining factor (Braverman *et al.*, 2003). Humphreys *et al.* (1973) analyzed the effect of host color on attractiveness. No significant attraction difference was noticed for *Culicoides guttipennis* (Coquillett) and *Culicoides sanguisuga* (Coquillett), the two most abundant species in Virginia, with black and white hosts. Braverman *et al.* (2003) observed that *C. imicola* avoided white areas, preferring to land on the dark haired areas of the body. The authors suggested that contrasts are probably important visual cues as well as temperature intensities. Interestingly, *C. brevitarsis* is not attracted when cattle is under cover. This could result from blocked vision but one can hypothesize that the cover also limits odors to disperse (Bishop *et al.*, 2008). The presence of animals is a key determinant for the size of *Culicoides* collections (Bellis and Reid, 1996; Baylis *et al.*, 2010), but the relationship between the biomass of animals on the attraction of *Culicoides* by a trap is not well known. Garcia-Saenz *et al.* (Garcia-Saenz *et al.*, 2011) described the influence of host number on the total catch of *Culicoides* using light trap. The number of specimens of the Obsoletus Group, the most abundant species collected during this study, increased proportionally with the number of sheep.

Several volatile compounds that mediate host-seeking behaviour in other hematophagous vectors have already been identified and tested in laboratory, semi-field or field studies. Carbon dioxide (CO₂) plays an important role, presumably for biting midge activation and attraction over longer distances. Nelson (Nelson, 1965) observed the positive response of *Culicoides variipennis* species complex to traps baited with CO₂ (with dry ice). Ammonia, lactic acid and carboxylic acids are released from host skin. Nevertheless, Gerry *et al.* (2009) traps baited with CO₂ collected fewer species than the other collection methods (UV-baited suction trap and sheep-baited trap). However, the factors determining the quantity of compounds and composition of the odor blend released from the host skin that mediate biting midge behaviour have received little attention. Recently, attraction with 1-octen-3-ol (Blackwell *et al.*, 1996) and CO₂ + 1-octen-3-ol (Bhasin *et al.*, 2000) were tested. For many *Culicoides* species, the combination of 1-octen-3-ol + CO₂ on baited traps increases the number of insects collected (Kline *et al.*, 1994). The efficacy of putative other attractants such as acetone, butanone, 1-octen-3-ol, phenol and three blends of seven phenolic compounds were also tested by Bhasin *et al.* (2001) on *Culicoides impunctatus* Goethgebuier in Scotland.

using odor-baited 'delta-traps' and suction traps. Acetone proved to be important attractant bait, and CO₂ plays a role in host location. Synergism between CO₂ and 1-octen-3-ol or CO₂ and acetone was observed. The addition of cow urine to 1-octen-3-ol greatly enhanced the catch efficacy compared to either cow urine or 1-octen-3-ol alone. Bishop *et al.* (2008) demonstrated that *C. brevitarsis* was attracted to CO₂ or CO₂ + octenol, but not to octenol alone. Bishop *et al.* (2008) proposed that *C. brevitarsis* first locates host using visual stimuli and then secondarily is attracted to CO₂ + octenol close to the host. Grant *et al.* (Grant and Kline, 2003) shown that maxillary palp sensilla neurons are responsive to stimulation with CO₂ but not to other olfactory attractants tested (1-octen-3-ol; 7 carbon ketones, 8 carbon, branched ketone and 6 carbon, branched ketone). Behavior responses of *Culicoides* species are dose-dependent to host odor (Bhasin *et al.*, 2001; Mands *et al.*, 2004). Mands *et al.* (2004) tested the efficacy of host odors from five hosts (sheep, red deer, calf, pony, water buffalo). All five host extracts were attractive to *C. impunctatus* with responses to deer and water buffalo extracts becoming significantly attractive at 10-fold higher concentration than other hosts extracts. In fine, identifying sensory signals the host releases and understanding how they are detected would help to develop adequate strategies to control the biting midges.

Host preference

Although many studies of host preferences have been conducted for various mosquito or tick vector species (Mukabana *et al.*, 2002; Humair *et al.*, 2007; Lyimo and Ferguson, 2009); it has been a neglected area for biting midges until the spread of bluetongue in Europe. Localized studies were implemented with animal baited traps but it is difficult to draw conclusions whether species are specialized or opportunist. Different strategies could help understanding host preferences: direct approach with collections on different host such as with direct aspiration or sticky traps on hosts, and indirect approaches with the analysis of the origin of blood meal with immunological or molecular tools. The first methodology has few been used for Palaearctic *Culicoides* species (Viennet *et al.*, 2011), though it is more easy and rigorous to analyze data from host-baited trap collections than from blood-meal identifications: less hypotheses on blood-meal distribution in host populations are necessary for the first method (Balenghien *et al.*, 2011).

Collecting engorged biting midges is challenging, and the most unbiased sampling method for engorged females would be directly in resting places, but to date, the resting places of *Culicoides* remain poorly described. Unbaited traps such as vehicle-mounted traps have been used but they are not easy to use in the field and the number of engorged females collected is very limited (Nelson and Bellamy, 1971; Roberts and Kumar, 1994). Baited light-traps are widely used for surveillance and research activities but the proportion in diversity and abundance of the population collected is not very well understood. When used with animal baits, light traps collected the active flying part of the population (males and females) with most of females being host-seeking. The difficulty to collect engorged *Culicoides* with regular trapping systems is a limiting factor to have a broad picture of the feeding behaviour of species, coupled with the necessity to have the host susceptible to be bited.

Most *Culicoides* species are suspected to be mammophilic, biting mostly domestic and wild mammals (Blackwell *et al.*, 1994; Linden *et al.*, 2010). Recent studies in the Palaearctic region showed that *C. obsoletus* was attracted and found blood-fed on sheep or goat (Carpenter *et al.*, 2008; Gerry *et al.*, 2009; Mullens *et al.*, 2010). *Culicoides parroti* Kieffer has been found feeding on horses and sheep (Mellor and McCaig, 1974; Gerry *et al.*, 2009). *Culicoides impunctatus* is mostly known for its generalist behaviour, while *C. circumscriptus* is considered to be a bird feeder (Blackwell *et al.*, 1994). In the United States, *Culicoides sphagnumensis* Williams, *Culicoides stilobezzioides* Foote and Pratt, *Culicoides travisi* Vargas, *C. sanguisuga*, *Culicoides crepuscularis* Malloch, *Culicoides Canadensis* Downes, *Culicoides biguttatus* (Coquillett), *C. spinosus* Root and Hoffman and *Culicoides piliferus* Root and Hoffman species group were collected in bird-baited traps by Greiner *et al.* (1978). Some species feed on reptiles and frogs (Votypka *et al.*, 2009). Some *Culicoides* species have been found to blood feed on engorged mosquito, as *Culicoides anophelis* Edwards (Edwards, 1923; Laird, 1946). Auezova (2008) shown that species can be collected from many host species, as man, different mammals, birds, and reptiles in Kazakhstan. Some species were collected exclusively on certain hosts (for instance on horse and cattle *Culicoides fascipennis* (Staege), *Culicoides grisescens* Edwards, *Culicoides maritimus* Kieffer and *C. pictipennis*; on poultry and wild birds *C. circumscriptus* and *Culicoides simulator* Edwards) whereas, other species were less selective as *C. obsoletus*, or even largely opportunistic as *C. turanicus* Gutsevich and Smatov collected on all studied hosts.

Indirect approaches on host preferences were investigated first with immunological assays (Tempelis, 1975; Washino and Tempelis, 1983; Pant *et al.*, 1987) and then with DNA-based assays (Mukabana *et al.*, 2002), with higher specificity and sensitivity (Townzen *et al.*, 2008; Alcaide *et al.*, 2009; Bartsch *et al.*, 2009; Lassen *et al.*, 2011). Identification of the origin of blood-meal allows to determinate the host range of species among potential hosts, even though at long distance from the trap. This was demonstrated for *Culicoides chiopterus* (Meigen) (Bartsch *et al.*, 2009; Garros *et al.*, 2010) allowing hypotheses of long active flight for engorged females.

Preferential landing and engorging sites

Investigations have been undertaken to study the landing and engorging body sites predilection of *Culicoides* species using different trapping methods. Direct aspiration is appropriate as described by Schmidtman *et al.* (1980) and Greiner *et al.* (1990) but worker presence can disturb collection (Viennet *et al.*, 2011). A sticky cover trap was designed and tested in the field and showed to be efficient to estimate biting rate for dominant species (Viennet *et al.*, 2011).

Literature data show that landing and engorging sites are different according to the *Culicoides* species, to the bait animals and to weather conditions and season. On horse, it has been observed that the mane and tail appear to be more often affected than the ventral midline (Riek, 1953; Mellor and McCaig, 1974; Townley *et al.*, 1984). Nevertheless, Anderson *et al.* (Anderson *et al.*, 1988) observed *C. obsoletus* attacking preferentially the ventral midline (Mellor and McCaig, 1974; Mullens *et al.*, 2005). *Culicoides imicola* prefers to land on horse or calf back (Braverman, 1988; Braverman *et al.*, 2003). Schmidtman *et al.* (1980) shown

that *C. biguttatus*, *C. obsoletus* and *Culicoides stellifer* (Coquillett) were attracted mainly in the belly regions of calves whereas *C. spinosus* was attracted to dorsal body regions (back and neck). On sheep and pony, *C. biguttatus*, *C. obsoletus* and *C. stellifer* were mostly captured from the belly. Attraction to the legs of grazing heifers was reported for *C. chiopterus* in Denmark (Overgaard Nielsen, 1971). Using a sticky cover trap, Viennet *et al.* (2011) showed that *Culicoides brunnicans* Edwards attacked all parts of the horse, whereas *C. obsoletus* seemed to attack preferentially lower parts and *Culicoides dewulfi* Goetghebuer the upper parts. On the contrary, Townley (1984), who explored the preferential landing and feeding sites of *Culicoides* on horses in Ireland, observed that the most abundant species, *C. obsoletus* and *C. dewulfi*, did not seem to have preferential landing sites whereas *Culicoides punctatus* (Meigen), *C. nubeculosus* and *Culicoides pulicaris* (Linnaeus) fed at the predilection sites of sweet itch. Preferential landing sites may differ for a same *Culicoides* species depending on the host, due to variations in hair wool density, colors and skin temperatures according to the host body parts.

Although the trap requires some improvements, the sticky cover trap should be used as standardized method in future studies to evaluate preferential sites of main abundant species.

Endo/exophagy – endo/exophily

The place where the blood meal is taken (endo/exophagy) and then digested (endo/exophily) is important to target housing sheds, to give appropriate recommendations and propose vector control strategies. Studies shown that different parameters may interfere. Nielsen and Christensen (1975) observed that different species of *Culicoides* were able to enter into the cowhouse depending on the season: in May, *C. punctatus*, *C. vexans*; early June, *C. punctatus*, *Culicoides subfasciipennis*. Kieffer, *Culicoides vexans* (Sateger), *C. obsoletus*, *Culicoides festivipennis* Kieffer (*Culicoides odibilis* Austen) and *C. nubeculosus*; in mid-June and in summer *C. nubeculosus* was the dominant species inside cowhouse. Using light-traps inside and outside stable, Anderson *et al.* (1993) observed that although the most abundant species, few specimens from Obsoletus Group (6%) were able to enter inside and attacked a horse. Baldet *et al.* (2008) investigated the *Culicoides* indoor and outdoor activity in northern France, and observed that Obsoletus Complex species and *C. dewulfi*, can be active not only outside the shed but also inside cattle shed at night. The indoor trapping rate (ITR) seemed to be dependent of the outside temperature. The authors raise attention of the host density near vicinity of the trap and openness of the building. Using host baited traps in three different locations (field, largely-open stable and closed stable), Viennet *et al.* (submitted) highlighted that *C. brunnicans* was clearly exophagic, whereas *C. obsoletus* was able to enter into buildings. The outdoor/indoor ratio of *C. obsoletus* abundance was higher in summer than in spring and autumn, and was dependent on building openings. Weather conditions are also primordial to explain changes in endo/exophagic behavior. In the Netherlands, *Culicoides* have been collected with UV-light/suction traps both inside and outside a partially open shed housing cattle (Meiswinkel *et al.*, 2008). Approximately, threefold more *Culicoides* have been collected outside than inside, but this trend was reversed on overcast day displaying eightfold more *Culicoides* inside than outside. In South Africa, the exophagic behavior of *C. imicola* lead to the stabling of horses some hours before sunset and

until a few hours after sunrise and was a great measure to prevent from African horse sickness (Meiswinkel *et al.*, 2000). However, Barnard (1997), using downdraught suction light-traps, shown that *C. imicola* entered horse stables passively and the presence of animals around may increase their abundance. Moreover, in Spain, *C. imicola* was collected consistently more inside than outside stables, compromising the protection measure which consisted on stabling of livestock to prevent from the diseases (Calvete *et al.* 2009). By placing sticky foil traps inside artificial nest boxes, Votypka *et al.* (2009) investigated which species enter nest to blood feed on birds. The main results showed that three ornitophilic species are endophagous (i.e. *Culicoides truncorum* Edwards, *Culicoides minutissimus* (Zetterstedt) and *C. pictipennis*).

Circadian rhythm

Circadian cycles of biting midge species are poorly described. It is widely assumed that *Culicoides* are mostly crepuscular and may continue to be active throughout the night; however, many species are also troublesome in the day displaying two biting peaks: one after sunrise the other close to sunset. These hours of attack can lengthen when low-light, overcast conditions prevail leading to biting throughout the day. *Culicoides paraensis* Wirth and Blanton is described as a common diurnal man-biting midge (Pinheiro *et al.*, 1981), with peak of activity occurring between 17h to 18h. Overall, only few studies have described rigorously *Culicoides* nycthemeral cycles with consecutive 24h collections (Barnard and Jones, 1980; Lillie *et al.*, 1987). Schmidtman *et al.* (1980) confirmed the nocturnal blood-feeding from bovine hosts by *Culicoides venustus* Hoffman, widespread in eastern North-America. *Culicoides variipennis* exhibits also two main peaks of activity, one around sunset and a secondary one near dawn (Nelson and Bellamy, 1971; Barnard and Jones, 1980; Linhares and Anderson, 1990; Mullens, 1995). Mullens (1995) suggested that the elevated parity in females collected during the middle of the night and after dawn might reflect a crepuscular oviposition pattern. Viennet *et al* (2011) showed that in spring, *C. brunnicans* exhibited a bimodal pattern of host-seeking activity with peaks just after sunrise and sunset, whereas *C. obsoletus* was active before sunset in spring and autumn and after sunset in summer, illustrating influence of other parameters than light, especially temperature.

Conclusions

Baseline data and detailed knowledge on the biology of biting midge species and especially of main species for the vectorial system are a prerequisite for implementation of any vector control strategies. Future research studies should focus on ecological obstacles to the vector control.

Description and variation in biting midge trophic behaviour: assumption is usely made that feeding and resting behaviour is stable in time and space for a species. However, long experiences from malaria mosquito have shown that trophic behaviour may change in response to domestic interventions. Moreover, variation in feeding behaviour within vector

species may have a genetic basis, which raises the possibility that vector control measures could select for genotypes which are least likely to encounter the intervention. Molecular assays and large scale studies may help to understand this aspect.

Vector diversity: Taxonomy of the genus *Culicoides* is complex and in need for revision. Certain candidate vector species are suspected to hide cryptic diversity and morphological or molecular forms are known within species that may have distinct ecological and behavioural niches. In addition to this complexity within primary vectors, low levels of transmission could be potentially maintained by a myriad of behaviourally and ecologically diverse secondary vectors. Although these species are routinely ignored because unknown or unsuspected, the diversity of vector species presents a huge challenge to conventional methods of vector control.

Behavioural avoidance: The emergence of new vector behavioural phenotypes is a less-recognized phenomenon than insecticide resistance (which is still unknown for *Culicoides*), but it has the potential to similarly diminish the effectiveness of current interventions. Documented examples of adaptable vector behaviours that could impact interventions are known for other vector groups and include changes in host-species preferences.

Dispersal and mating behaviour: Knowledge of biting midge dispersal range is essential for accurate predictions of the optimal spatial implementation of conventional control methods. Unfortunately, direct observations of the dispersal ability of *Culicoides* species are limited, and few generalities can be made for this behaviour.

Priority areas will include understanding aspects of the biting midge life cycle beyond the blood feeding processes which directly mediate *Orbivirus* transmission.

References

- Alcaide, M., Rico, C., Ruiz, S., Soriguer, R., Munoz, J. & Figuerola, J. (2009) Disentangling vector-borne transmission networks: a universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals. *PLoS One*, **4**, e7092.
- Anderson, G. S., Belton, P. & Belton, E. M. (1993) A population study of *Culicoides obsoletus* Meigen (Diptera, Ceratopogonidae), and other *Culicoides* species in the Fraser Valley of British-Columbia. *Canadian Entomologist*, **125**, 439-447.
- Anderson, G. S., Belton, P. & Kleider, N. (1988) The hypersensitivity of horses to *Culicoides* bites in British Columbia. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne*, **29**, 718-723.
- Auezova, G. A. (2008) Hosts and trophic specialization of bloodsucking biting midges (Diptera: Ceratopogonidae, Leptoconopidae) in southeastern Kazakhstan. *Russian Entomology Journal*, **17**, 19-24.
- Baldet, T., Delécolle, J. C., Cetre-Sossah, C., Mathieu, B., Meiswinkel, R. & Gerbier, G. (2008) Indoor activity of *Culicoides* associated with livestock in the bluetongue virus (BTV) affected region of Northern France during autumn 2006. *Preventive Veterinary Medicine*, **87**, 84-97.
- Balenghien, T., Fouque, F., Sabatier, P. & Bicout, D. J. (2011) Theoretical formulation for mosquito host-feeding patterns: application to a West Nile virus focus of Southern France. *Journal of Medical Entomology*, **48**, 15.
- Barnard, B. J. H. (1997) Some factors governing the entry of *Culicoides* spp. (Diptera : Ceratopogonidae) into stables. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **64**, 227-233.
- Barnard, D. R. & Jones, R. H. (1980) Diel and seasonal patterns of flight activity of Ceratopogonidae in Northeastern Colorado: *Culicoides*. *Environmental Entomology*, **9**, 446-451.
- Bartsch, S., Bauer, B., Wiemann, A., Clausen, P. H. & Steuber, S. (2009) Feeding patterns of biting midges of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* groups on selected farms in Brandenburg, Germany. *Parasitology Research*, **105**, 373-380.
- Baylis, M., Parkin, H., Kreppel, K., Carpenter, S., Mellor, P. S. & McIntyre, K. M. (2010) Evaluation of housing as a means to protect cattle from *Culicoides* biting midges, the vectors of bluetongue virus. *Medical and Veterinary Entomology*, **24**, 38-45.
- Bellis, G. A. & Reid, D. J. (1996) Sampling bias in determining the parous rate of collections of *Culicoides brevitarsis* Kieffer and *Culicoides wadai* Kitaoka (Diptera: Ceratopogonidae). *Australian Journal of Entomology*, **35**, 319-322.
- Bhasin, A., Mordue, A. J. & Mordue, W. (2000) Responses of the biting midge *Culicoides impunctatus* to acetone, CO₂ and 1-octen-3-ol in a wind tunnel. *Medical and Veterinary Entomology*, **14**, 300-307.
- Bhasin, A., Mordue, A. J. & Mordue, W. (2001) Field studies on efficacy of host odour baits for the biting midge *Culicoides impunctatus* in Scotland. *Medical and Veterinary Entomology*, **15**, 147-156.
- Bidlingmayer, W. L. (1961) Field activity studies of adult *Culicoides furens*. *Annals of Entomological Society of America*, **59**, 149-156.

- Bishop, A. L., Barchia, I. M. & Spohr, L. J. (2000) Models for the dispersal in Australia of the arbovirus vector, *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera : Ceratopogonidae). *Preventive Veterinary Medicine*, **47**, 243-254.
- Bishop, A. L., McKenzie, H. J. & Spohr, L. J. (2008) Attraction of *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera : Ceratopogonidae) and *Culex annulirostris* Skuse (Diptera : Culicidae) to simulated visual and chemical stimuli from cattle. *Australian Journal of Entomology*, **47**, 121-127.
- Blackwell, A., Dyer, C., Mordue, A. J., Wadhams, L. J. & Mordue, W. (1994) Field and laboratory evidence for a volatile pheromone produced by parous females of the scottish biting midge, *Culicoides impunctatus*. *Physiological Entomology*, **19**, 251-257.
- Blackwell, A., Dyer, C., Mordue, A. J., Wadhams, L. J. & Mordue, W. (1996) The role of 1-octen-3-ol as a host-odour attractant for the biting midge, *Culicoides impunctatus* Goetghebuer, and interactions of 1-octen-3-ol with a volatile pheromone produced by parous female midges. *Physiological Entomology*, **21**, 15-19.
- Blackwell, A., Luntz, A. J. M. & Mordue, W. (1992) Morphology of the antennae of 2 species of biting midge - *Culicoides impunctatus* (Goetghebuer) and *Culicoides nubeculosus* (Meigen) (Diptera, Ceratopogonidae). *Journal of Morphology*, **213**, 85-103.
- Blackwell, A., Mordue (Luntz), A. J. & Mordue, W. (1994) Identification of bloodmeals of the Scottish biting midge, *Culicoides impunctatus*, by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Medical and Veterinary Entomology*, **8**, 20-24.
- Braverman, Y. (1970) An improved emergence trap for *Culicoides*. *Journal of Economic Entomology*, **63**, 1674-1675.
- Braverman, Y. (1988) Preferred landing sites of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) on a horse in Israel and its relevance to summer seasonal recurrent dermatitis (sweet itch). *Equine Veterinary Journal*, **20**, 426-429.
- Braverman, Y. & Chechik, F. (1996) Air streams and the introduction of animal diseases borne on *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) into Israel. *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties*, **15**, 1037-1052.
- Braverman, Y., Rechtman, S., Frish, A. & Braverman, R. (2003) Dynamics of biting activity of *C. imicola* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) during the year. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, **58**, 46-56.
- Braverman, Y., Ungar-Waron, H., Frith, K., Adler, H., Danieli, Y., Baker, K. P., *et al.* (1983) Epidemiological and immunological studies of sweet itch in horses in Israel. *Veterinary Record*, **112**, 521-524.
- Campbell, M. & Kettle, D. (1979) Swarming of *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) with reference to markers, swarm size, proximity of cattle, and weather. *Australian Journal of Zoology*, **27**, 17-30.
- Capela, R., Purse, B. V., Pena, I., Wittman, E. J., Margarita, Y., Capela, M., Romao, L., Mellor, P. S., Baylis, M. (2003) Spatial distribution of *Culicoides* species in Portugal in relation to the transmission of African horse sickness and bluetongue viruses. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, 165-177.

- Carpenter, S., Szmaragd, C., Barber, J., Labuschagne, K., Gubbins, S. & Mellor, P. (2008) An assessment of *Culicoides* surveillance techniques in northern Europe: have we underestimated a potential bluetongue virus vector? *Journal of Applied Ecology*, **45**, 1237-1245.
- Chapman, J. W., Reynolds, D. R., Smith, A. D., Smith, E. T. & Woiwod, I. P. (2004) An aerial netting study of insects migrating at high altitude over England. *Bulletin of Entomological Research*, **94**, 123-136.
- Collins, R. C. & Jones, R. H. (1978) Laboratory transmission of *Onchocerca Cervicallis* with *Culicoides variipennis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **27**, 46-50.
- Cummings, E. & James, E. R. (1985) Prevalence of equine onchocerciasis in southeastern and midwestern United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **186**, 1202-1203.
- Davies, J. B. (1966) An evaluation of the emergence or box trap for estimating sand fly (*Culicoides* spp. Heleidae) population. *Mosquito News*, **26**, 69-72.
- Downes, J. A. (1950) Habits and life-cycle of *Culicoides nubeculosus* (Mg.). *Nature*, **166**, 510-511.
- Downes, J. A. (1955) Observations on the swarming flight and mating of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, **106**, 213-236.
- Downes, J. A. (1978) Feeding and mating in the insectivorous Ceratopogonidae (Diptera). In *Memoirs of the Entomological Society Of Canada* (ed. by P. E. Morrison). The Entomological Society Of Canada, Ottawa, **110**, 1-62.
- Du Toit, R. M. (1944) The transmission of bluetongue and horse-sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, **19**, 7-16.
- Edwards, F. W. (1923) New and old observations on Ceratopogonidae midges attacking other insects. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **17**, 19-29.
- Garcia-Saenz, A., McCarter, P. & Baylis, M. (2011) The influence of host number on the attraction of biting midges, *Culicoides* spp., to light traps. *Medical and Veterinary Entomology*, **25**, 113-115.
- Garros, C., Mathieu, B., Balenghien, T., Cetre-Sossah, C. & Delecolle, J. C. (2010) Suggesting synonymies? Comments on Kiehl et al. (2009) "The European vectors of Bluetongue virus: are there species complexes, single species or races in *Culicoides obsoletus* and *C. pulicaris* detectable by sequencing ITS-1, ITS-2 and 18S-rDNA?". *Parasitology Research*, **107**, 731-734.
- Gerry, A. C., Monteys, V. S. I., Vidal, J. O. M., Francino, O. & Mullens, B. A. (2009) Biting rates of *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) on sheep in northeastern Spain in relation to midge capture using UV light and carbon dioxide-baited traps. *Journal of Medical Entomology*, **46**, 615-624.
- Glick, P. A. (1939) The distribution of insects, spiders, and mites in the air. *Technical Bulletin U. S. Department of Agriculture*, **673**, 1-150.
- Grant, A. J. & Kline, D. L. (2003) Electrophysiological responses from *Culicoides* (Diptera : ceratopogonidae) to stimulation with carbon dioxide. *Journal of Medical Entomology*, **40**, 284-292.
- Greiner, E. C., Eveleigh, E. S. & Bonne, W. M. (1978) Ornithophilic *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) from New Brunswick, Canada, and implications of their involvement in Haemoproteid transmission. *Journal of Medical Entomology*, **14**, 701-704.
- Greiner, E. C., Fadok, V. A. & Rabin, E. B. (1990) Equine *Culicoides* hypersensitivity in Florida: biting midges aspirated from horses. *Medical and Veterinary Entomology*, **4**, 375-381.

- Haddow, A. J. & Dick, G. W. A. (1948) Catches of biting Diptera in Uganda, with anaesthetized monkeys as bait. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **42**, 271-277.
- Hardy, A. C. & Cheng, L. (1986) Studies in the distribution of insects by aerial currents: 3. Insect drift over the sea. *Ecological Entomology*, **11**, 283-290.
- Hardy, W. T. & Price, D. A. (1952) Soremuzzle of sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **120**, 23-25.
- Humair, P.-F., Douet, V., Moran Cadenas, F., Schouls, L., Van De Pol, I. & Gern, L. (2007) Molecular identification of blood meal source in *Ixodes ricinus* ticks using I2S rDNA as a genetic marker. *Journal of Medical Entomology*, **44**, 869-880.
- Humphreys, J. G. & Turner, J. E. C. (1973) Blood-feeding activity of female *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, **10**, 79-83.
- Johansen, C. A., Farrow, R. A., Morrisen, A., Foley, P., Bellis, G. A., van den Hurk, A. F., *et al.* (2003) Collection of wind-borne haematophagous insects in the Torres Strait, Australia. *Medical and Veterinary Entomology*, **17**, 102-109.
- Kettle, D. S. (1951) The spatial distribution of *Culicoides impunctatus* Goet. under woodland and moorland conditions and its flight range through woodland. *Bulletin of Entomological Research*, **42**, 239-291.
- Kettle, D. S. (1960) The flight of *Culicoides impunctatus* Goetghebuer (Diptera: Ceratopogonidae) over moorland and its bearing on midge control. *Bulletin of Entomological Research*, **51**, 461-490.
- Kettle, D. S. (1962) The bionomics and control of *Culicoides* and *Leptoconops* (Diptera, Ceratopogonidae=Heleidae). *Annual Review of Entomology*, **7**, 401-418.
- Kline, D. L., Hagan, D. V. & Wood, J. R. (1994) *Culicoides* responses to 1-octen-3-ol and carbon-dioxide in salt marshes near Sea Island, Georgia, USA. *Medical and Veterinary Entomology*, **8**, 25-30.
- Laird, M. (1946) A Ceratopogonide midge (*Culicoides anophelis* Edwards, 1922) sucking engorged blood from a mosquito (*Armigeres lacuum* Edwards, 1922) at Palmalmal, New Britain. *Transactions of the Royal Society of the New Zealand*, **76**, 158-161.
- Lassen, S. B., Nielsen, S. A., Skovgard, H. & Kristensen, M. (2011) Molecular identification of bloodmeals from biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides* Latreille) in Denmark. *Parasitology Research*, **108**, 823-829.
- Lillie, T. H., Kline, D. L. & Hall, D. W. (1987) Diel and seasonal activity of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) Near Yankeetown, Florida, Monitored with a vehicle-mounted insect trap. *Journal of Medical Entomology*, **24**, 503-511.
- Lillie, T. H., Marquard, W. C. & Jones, R. H. (1981) The flight range of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *The Canadian Entomologist*, **133**, 419-426.
- Linden, A., Gregoire, F., Nahayo, A., Hanrez, D., Mousset, B., Massart, A. L., *et al.* (2010) Bluetongue virus in wild deer Belgium, 2005-2008. *Emerging Infectious Diseases*, **16**, 833-836.
- Linhares, A. X. & Anderson, J. R. (1990) The influence of temperature and moonlight on flight activity of *Culicoides variipennis* (Coquillett) (Diptera: Ceratopogonidae) in northern California. *Pan-Pacific Entomologist*, **66**, 199-207.

- Linley, J. R. & Adams, G. M. (1972) Ecology and behavior of immature *Culicoides melleus* (Coq.) (Dipt., Ceratopogonidae). *Bulletin of Entomological Research*, **62**, 113-127.
- Linley, J. R., Evans, F. D. S. & Evans, H. T. (1970) Seasonal emergence of *Culicoides furens* (Diptera: Ceratopogonidae) at Vero Beach, Florida. *Annals of the Entomological Society of America*, **63**, 1332-1339.
- Lyimo, I. N. & Ferguson, H. M. (2009) Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. *Trends in Parasitology*, **25**, 189-196.
- Mands, V., Kline, D. L. & Blackwell, A. (2004) *Culicoides* midge trap enhancement with animal odour baits in Scotland. *Medical and Veterinary Entomology*, **18**, 336-342.
- McCall, P. J. & Trees, A. J. (1993) Onchocerciasis in British cattle: a study of the transmission of *Onchocerca* sp. in North Wales. *Journal of Helminthology*, **67**, 123-135.
- Meiswinkel, R., Baylis, M. & Labuschagne, K. (2000) Stabling and the protection of horses from *Culicoides bolitinos* (Diptera : Ceratopogonidae), a recently identified vector of African horse sickness. *Bulletin of Entomological Research*, **90**, 509-515.
- Meiswinkel, R., Goffredo, M., Dijkstra, E. G. M., van der Ven, I. J. K., Baldet, T. & Elbers, A. (2008) Endophily in *Culicoides* associated with BTV-infected cattle in the province of Limburg, South-Eastern Netherlands, 2006. *Preventive Veterinary Medicine*, **87**, 182-195.
- Mellor, P. S. (2004) Infection of the vectors and bluetongue epidemiology in Europe. *Veterinaria Italiana*, **40** (3), 176-181.
- Mellor, P. S., Boorman, J. & Baylis, M. (2000) *Culicoides* biting midges: Their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology*, **45**, 307-340.
- Mellor, P. S. & McCaig, J. (1974) The probable cause of "sweet itch" in England. *Veterinary Record*, **95**, 411-415.
- Mukabana, W. R., Takken, W. & Knols, B. G. J. (2002) Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. *Trends in Parasitology*, **18**, 505-509.
- Mullens, B. A. (1995) Flight activity and response to carbon-dioxide of *Culicoides variipennis sonorensis* (Diptera, Ceratopogonidae) in Southern California. *Journal of Medical Entomology*, **32**, 310-315.
- Mullens, B. A., Gerry, A. C., Monteys, V. S. I., Pinna, M. & Gonzalez, A. (2010) Field studies on *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) activity and response to deltamethrin applications to sheep in northeastern Spain. *Journal of Medical Entomology*, **47**, 106-110.
- Mullens, B. A., Owen, J. P., Heft, D. E. & Sobeck, R. V. (2005) *Culicoides* and other biting flies on the Palos Verdes Peninsula of Southern California, and their possible relationship to equine dermatitis. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **21**, 90-95.
- Murray, M. D. (1987) Local dispersal of the biting midge *Culicoides brevitaris* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) in south-eastern Australia. *Australian Journal of Zoology*, **35**, 559-573.
- Murray, M. D. & Kirkland, P. D. (1995) Bluetongue and Douglas virus activity in New-South-Wales in 1989 - Further evidence for long-distance dispersal of the biting midge *Culicoides brevitaris*. *Australian Veterinary Journal*, **72**, 56-57.

- Nelson, R. L. (1965) Carbon dioxide as an attractant for *Culicoides*. *Journal of Medical Entomology*, **2**, 56-57.
- Nelson, R. L. & Bellamy, R. E. (1971) Patterns of flight activity of *Culicoides variipennis* (Coquillett) (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, **8**, 283-291.
- Nielsen, B. O. & Christensen, O. (1975) A mass attack by biting midge *Culicoides nubeculosus* (Mg.) (Diptera, Ceratopogonidae) on grazing cattle in Denmark a new aspect of sewage discharge. *Nordisk Veterinaermedicin*, **27**, 365-372.
- Ninio, C., Augot, D., Dufour, B. & Depaquit, J. (2011) Emergence of *Culicoides obsoletus* from indoor and outdoor breeding sites. *Veterinary Parasitology*, **5**.
- Ottley, M. I., Dallemagne, C. & Moorhouse, D. E. (1983) Equine onchocerciasis in Queensland and the Northern Territory of Asutralia. *Australian Veterinary Journal*, **60**, 200-203.
- Overgaard Nielsen, B. (1971) Some observations on biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) attacking grazing cattle in Denmark. *Entomologica Scandinavica*, **2**, 94-98.
- Pant, C. P., Houba, V. & Engers, H. D. (1987) Blood meal identification in vectors. *Parasitology Today*, **3**, 324-326.
- Pinheiro, F. P., Travassos da Rosa, A. P. A., Travassos da Rosa, J. F. S., Ishak, R., Freitas, R. B., Gomes, M. L. C., *et al.* (1981) Oropouche virus I. a review of clinical , epidemiological and ecological findings. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **30**, 149-160.
- Purse, B. V., Mellor, P. S., Rogers, D. J., Samuel, A. R., Mertens, P. P. C. & Baylis, M. (2005) Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 171-181.
- Reynolds, D. R., Smith, A. D. & Chapman, J. W. (2008) A radar study of emigratory flight and layer formation by insects at dawn over southern Britain. *Bulletin of Entomological Research*, **98**, 35-52.
- Riek, R. F. (1953) Studies on allergic dermatitis ('Queensland itch') of the horse. I. Description, distribution, symptoms and pathology. *Australian Veterinary Journal*, **29**, 177-184.
- Roberts, D. & Kumar, S. (1994) Using vehicle-mounted nets for studying activity of Arabian sand flies (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, **31**, 388-393.
- Sanders, C. J., Selby, R., Carpenter, S. & Reynolds, D. R. (2011) High-altitude flight of *Culicoides* biting midges. *Veterinary Record*, **2**.
- Schmidtman, E. T., Abend, J. F. & Valla, M. E. (1980) Nocturnal blood-feeding from pastured calves by the Ceratopogonid midge, *Culicoides venustus*, in New York State. *Mosquito News*, **40**, 571-577.
- Schmidtman, E. T., Jones, C. J. & Gollands, B. (1980) Comparative host-seeking attractivity of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) attracted to pastured livestock in Central New York State, USA. *Journal of Medical Entomology*, **17**, 221-231.
- Sellers, R. F. (1980) Weather, host and vector - their interplay in the spread of insect-borne animal virus diseases. *Journal of Hygiene (London)*, **85**, 65-102.
- Tempelis, C. H. (1975) Host-feeding patterns of mosquitoes, with a review of advances in analysis of blood meals by serology. *Journal of Medical Entomology*, **11**, 635-653.

- Torina, A., Caracappa, S., Mellor, P. S., Baylis, M., Purse, B. V. (2004) Spatial distribution of bluetongue virus and its *Culicoides* vectors in Sicily. *Medical and Veterinary Entomology*, **18**, 81-89.
- Townley, P., Baker, K. P. & Quinn, P. J. (1984) Preferential landing and engorging sites of *Culicoides* species landing on a horse in Ireland. *Equine Veterinary Journal*, **16**, 117-120.
- Townzen, J. S., Brower, A. V. Z. & Judd, D. D. (2008) Identification of mosquito bloodmeals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, **22**, 386-393.
- Viennet, E., Garros, C., Gardès, L., Rakotoarivony, I., Allène, X., Lancelot, R., *et al.* (2012) Host preferences of Palaearctic *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): implications for *Orbivirus* transmission. *Medical and Veterinary Entomology*.submitted
- Viennet, E., Garros, C., Lancelot, R., Allene, X., Gardes, L., Rakotoarivony, I., *et al.* (2011) Assessment of vector/host contact: comparison of animal-baited traps and UV-light/suction trap for collecting *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of Orbiviruses. *Parasites & Vectors*, **4**, 119.
- Votypka, J., Synek, P. & Svobodova, M. (2009) Endophagy of biting midges attacking cavity-nesting birds. *Medical and Veterinary Entomology*, **23**, 277-280.
- Walker, A. R. (1977) Seasonal fluctuations of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in Kenya. *Bulletin of Entomological Research*, **67**, 217-233.
- Washino, R. K. & Tempelis, C. H. (1983) Mosquito host bloodmeal identification -Methodology and data analysis. *Annual Review of Entomology*, **28**, 179-201.
- Yeruham, I., Braverman, Y. & Orgad, U. (1993) Field observations in Israel on hypersensitivity in cattle, sheep and donkeys caused by *Culicoides*. *Australian Veterinary Journal*, **70**, 348-352.
- Zimmerman, R. H., Barker, S. J. & Turner, E. C. (1982) Swarming and mating behavior of a natural population of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, **19**, 151-156.

Discussion du chapitre 1

Présents dans le monde entier, sauf dans les régions polaires et sans doute quelques îles comme Hawaï ou la Nouvelle-Zélande, les *Culicoides* ont été décrits pour la première fois au 18^e siècle. Nuisants redoutables, ils ont été incriminés deux siècles plus tard comme vecteurs de virus et de filaires. Au 20^e siècle, les *Culicoides* étaient reconnus comme causes majeures de perturbation des activités touristiques aux Etats-Unis, incommodant par leurs piqûres douloureuses et les allergies consécutives. C'est en Afrique du Sud, que se situent les premières études sur le rôle vecteur des *Culicoides*, notamment avec le lien entre la transmission du virus de la peste équine et leur activité. Puis un rapprochement a été fait entre la transmission du virus de la peste équine et celle du virus de la fièvre catarrhale ovine. Pendant longtemps, l'intérêt pour les espèces de *Culicoides* provenait surtout des pays touchés par la FCO, la peste équine et par les conséquences de leur agressivité, à quelques exceptions près. Par exemple, une équipe de la Faculté de médecine de Strasbourg en France s'est illustrée par son expertise sur la taxonomie et la description des espèces de Ceratopogonidae, dont les *Culicoides* et par la collection associée.

En Europe, la FCO a été considérée pendant longtemps, comme une maladie exotique. A la fin des années 1990, d'importantes épizooties se sont déclenchées dans l'ensemble du bassin méditerranéen. Ces zones, où jusque-là la FCO était inconnue, correspondent à des zones nouvellement colonisées ou déjà peuplées par *C. imicola*, vecteur avéré du virus, qui a vu son aire de distribution remonter vers le nord. L'augmentation des températures serait la principale explication de sa progression vers le nord. A partir de 2006, la FCO prend une ampleur particulière en Europe, avec son introduction et son intense transmission, avec des conséquences sanitaires et économiques désastreuses. La transmission de la FCO dans l'Europe non méditerranéenne n'est pas liée à *C. imicola*, absent de ces régions. Ainsi, deux systèmes épidémiologiques se présentent avec la remontée vers le nord d'un vecteur avéré *C. imicola*, et au nord de la « ligne-*imicola* » (là où ce vecteur est absent), la présence d'espèces autochtones capables de transmettre le virus.

L'apparition de cette maladie dans le bassin méditerranéen, puis en Europe non méditerranéenne, a mis en évidence la nécessité de décrire les mécanismes de transmission.

La revue réalisée a permis de faire le point sur les acquis, les hypothèses et les lacunes à combler concernant la biologie et l'écologie des adultes *Culicoides*, notamment concernant les gîtes de repos, gîtes d'émergence, le comportement de reproduction, le flux des gènes, la dispersion, les interactions virus/vecteurs, la diapause. Elle vient en complément de celle de Kettle (1962) sur la bionomie et le contrôle des genres *Culicoides* et *Leptoconops*.

Chapitre 2 :

**Estimation du contact hôte/vecteur : comparaison des
pièges à appât et du piège à lumière ultraviolette pour
la capture de *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae),
vecteurs d'*Orbivirus***

Introduction au chapitre 2

Après avoir fait l'état de l'art sur la biologie et l'écologie des espèces adultes de *Culicoides*, il apparaît clair que nombre de caractéristiques écologiques sont toujours mal identifiées chez les *Culicoides*, et en particulier chez les espèces potentiellement impliquées dans la transmission du virus de la fièvre catarrhale ovine en Europe.

Leur comportement trophique (recherche d'hôte, préférence trophique) est toujours très peu décrit, notamment à cause de la difficulté d'observer et de collecter ces petits moucheron directement sur l'hôte. La localisation d'un hôte par l'insecte est le résultat d'une série d'événements comportementaux et physiologiques complexes. La mise en œuvre d'études portant sur le comportement trophique nécessite de ce fait la prise en compte de nombreux paramètres et une interprétation prudente des résultats, à commencer par l'utilisation d'une méthode d'échantillonnage adaptée. Toutes les méthodes de capture échantillonnent une partie de la population des insectes présents, avec plus ou moins de biais. Par exemple, les pièges à CO₂, très utilisés et très efficaces pour estimer l'abondance des populations de moustiques, ne sont que très peu efficaces pour capturer *Ae. albopictus* (Gingrich and Williams, 2005). Aussi, il est facile de mal interpréter un comportement lorsque les méthodes de piégeage ne sont pas appropriées ou sont mal connues.

La méthode la plus utilisée, car la plus simple, pour échantillonner les populations de *Culicoides* est un piège à lumière ultraviolette – l'incrimination d'espèces en tant que vecteur potentiel s'est d'ailleurs basée principalement sur des données d'abondance recueillies par des piégeages lumineux. Or, cette méthode permet de capturer uniquement les espèces présentant une activité crépusculaire ou nocturne, mais surtout s'avère ne pas refléter correctement la diversité et l'abondance des espèces attaquant les hôtes d'intérêt (Carpenter *et al.*, 2008). En effet, ce piège semble sous-estimer le taux de piquûre de *C. chiopterus* sur-estimer celui de *C. obsoletus* et sous-estimer celui de *C. parroti* sur mouton (Carpenter *et al.*, 2008; Gerry *et al.*, 2009). La mesure, sur le terrain, du taux de contact entre un vecteur et son hôte – paramètre indispensable pour mesurer le niveau de risque de transmission – nécessite, la plupart du temps, des captures sur appât, qui reste la méthode la plus directe (Garrett-Jones, 1964; Silver and Service, 2008).

Très peu de collectes ont été réalisées directement sur hôte dans le but d'étudier le comportement des espèces de *Culicoides* paléarctiques. Les deux principales méthodes de piégeage sont le *drop trap* (Schmidtman *et al.*, 1980; Carpenter *et al.*, 2008) et l'aspiration directe (Schmidtman *et al.*, 1980; Gerry *et al.*, 2009). Les manipulations permanentes des pièges engendrent un lourd investissement technique. Par ailleurs, les biais de ces différentes méthodes de capture n'ont pas été évalués. Nous avons donc, dans un premier temps, développé un nouveau piège à appât, dont le principe est d'ajuster une couverture collante directement sur l'animal, les insectes se posant sur l'animal restent alors collés à la couverture. Puis, dans un second temps, nous avons comparé les méthodes classiques de capture sur appât (aspiration directe et *drop trap*), avec le piège à couverture collante, et le piège à lumière ultra-violette. Les collectes ont été réalisées de 14h45 avant à 14h45 après le coucher du soleil en juin/juillet 2009 dans une ferme expérimentale ovine (INRA, Nouzilly,

Ouest de la France). Une procédure en carrés latins (blocs aléatoires de 4 sites \times 4 pièges avec 3 répétitions) a été utilisée pour contrôler les effets des sites de capture. Les *Culicoides* capturés ont été identifiés et triés morphologiquement par espèce, sexe et stade physiologique pour les femelles. Les espèces jumelles ont été séparées par identification avec des outils de biologie moléculaire. Les données d'abondance des espèces dominantes ont été modélisées par un modèle mixte de Poisson et le taux de parité pour chaque espèce par un modèle mixte Binomial. La date de collecte ainsi que le site sont les effets aléatoires croisés et le piège l'effet fixe. Pour les espèces moins abondantes, l'abondance a été analysée en utilisant le modèle de Hurdle afin de prendre en compte l'excès de zéro.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans le journal *Parasites & Vectors*, qui est reproduit dans la suite du manuscrit.

RESEARCH

Open Access

Assessment of vector/host contact: comparison of animal-baited traps and UV-light/suction trap for collecting *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of Orbiviruses

Elvina Viennet^{1*}, Claire Garros¹, Renaud Lancelot¹, Xavier Allène¹, Laëtitia Gardès¹, Ignace Rakotoarivony¹, Didier Crochet², Jean-Claude Delécolle³, Catherine Moulia⁴, Thierry Baldet¹ and Thomas Balenghien^{1*}

Abstract

Background: The emergence and massive spread of bluetongue in Western Europe during 2006-2008 had disastrous consequences for sheep and cattle production and confirmed the ability of Palearctic *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) to transmit the virus. Some aspects of *Culicoides* ecology, especially host-seeking and feeding behaviors, remain insufficiently described due to the difficulty of collecting them directly on a bait animal, the most reliable method to evaluate biting rates.

Our aim was to compare typical animal-baited traps (drop trap and direct aspiration) to both a new sticky cover trap and a UV-light/suction trap (the most commonly used method to collect *Culicoides*).

Methods/results: Collections were made from 1.45 hours before sunset to 1.45 hours after sunset in June/July 2009 at an experimental sheep farm (INRA, Nouzilly, Western France), with 3 replicates of a 4 sites × 4 traps randomized Latin square using one sheep per site. Collected *Culicoides* individuals were sorted morphologically to species, sex and physiological stages for females. Sibling species were identified using a molecular assay. A total of 534 *Culicoides* belonging to 17 species was collected. Abundance was maximal in the drop trap (232 females and 4 males from 10 species) whereas the diversity was the highest in the UV-light/suction trap (136 females and 5 males from 15 species). Significant between-trap differences abundance and parity rates were observed.

Conclusions: Only the direct aspiration collected exclusively host-seeking females, despite a concern that human manipulation may influence estimation of the biting rate. The sticky cover trap assessed accurately the biting rate of abundant species even if it might act as an interception trap. The drop trap collected the highest abundance of *Culicoides* and may have caught individuals not attracted by sheep but by its structure. Finally, abundances obtained using the UV-light/suction trap did not estimate accurately *Culicoides* biting rate.

Background

Culicoides biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) are among the smallest hematophagous insects and a pest to livestock and humans [1]. They also can transmit several important *Orbivirus* (Reoviridae) such as African horse sickness virus to equids or bluetongue virus (BTV) to ruminants [1]. Bluetongue was considered an exotic disease in Europe until the spread of multiple

BTV strains throughout the Mediterranean Basin from 1998 to the present day, mainly in association with the presence of *Culicoides imicola* Kieffer, the main Afro-tropical vector species [2]. During 2006, a BTV8 epizootic occurred in five member states of north-western Europe in the absence of *C. imicola* confirming that some autochthonous Palearctic *Culicoides* species are able to transmit BTV [3]. However, the virus quickly spread to other countries in the following years infecting a surprising number of farms through Europe (for instance about 27,000 BTV8 and 5,000 BTV1 outbreaks in the French mainland in 2008) leading to disastrous

* Correspondence: elvina.viennet@cirad.fr; thomas.balenghien@cirad.fr

¹CIRAD, UMR Contrôle des maladies, F-34398 Montpellier, France
 Full list of author information is available at the end of the article

consequences for the livestock industry with huge economic losses [4].

Many aspects of *Culicoides* ecology remain unknown especially for species suspected to be involved in BTV8 transmission in Europe [1,5]. Their host-seeking and feeding behaviors are poorly described partially because of the difficulty in collecting these small insects directly on animals. Direct collection from animals is considered the most reliable method to study the vector/host ratio [6], an essential parameter to model vectorial capacity and virus transmission [7]. Only a few collections of Palaearctic *Culicoides* have been carried out directly on hosts [8-13]. Direct aspiration and drop trap, the most common host-baited collection, have been compared to artificially baited traps especially the ultraviolet (UV) light/suction trap [12,13], which is the most widespread method to collect *Culicoides*. UV-light/suction traps seemed to underestimate biting rates of *Culicoides chiopterus* (Meigen) [12], *Culicoides obsoletus* (Meigen) and *Culicoides parroti* Kieffer [13] and to overestimate the biting rate of *C. imicola* [13] on sheep. However host-baited traps have never been compared with each other, or simultaneously to a light trap.

The aim of this study was to improve our ability to accurately describe the *Culicoides* ecology by identifying the best trapping assessment of the vector biodiversity and the biting rate in north-western Europe. We compared standard animal-baited traps (drop trap and direct aspiration), to a novel trapping system which utilized sticky panels and to a UV-light/suction trap commonly used in *Culicoides* surveillance.

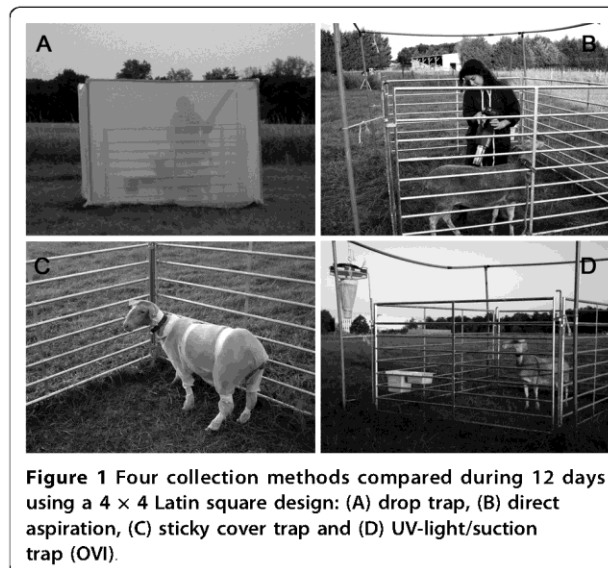
Materials and methods

Our strategy was to use a randomized Latin square design to compare the assessment of the biting rate by each animal-baited trap and to identify potential bias when UV-light/suction trapping might be used to estimate the biting rate.

Description of collection methods

Four collection methods were compared during this trial (Figure 1).

The drop trap (DT) consists in a rectangular cage in shape (2.5 m wide × 3 m long and 2 m high) recovered with white polyester netting (< 0.25 mm² mesh size) [12]. Initially, a single sheep is exposed for 10 min with the netted sides of the cage raised and the observer remaining at a distance of approximately 50 m from the trap. Thereafter, the observer returns to lower the net, making sure that no insect can enter or escape, and left the site for another 10 min. Then, the observer entered the netted cage and vacuums the 4 sides plus the roof for about 10 min using a modified CDC Backpack aspirator (model 1412, John W. Hock company, [http://](http://www.johnwhock.com)



www.johnwhock.com) with fine mesh cups (adapted to biting midges with < 0.25 mm² mesh size) to collect any *Culicoides* present. On completion of this period, the drop net is raised for an additional 10 min exposure period.

The second type of animal-baited trap assessed consisted in direct aspiration (DA) on an animal. A single sheep tethered to a cage was exposed for 10 min - the observer remaining at a distance of approximately 50 m from the animal. Then the observer vacuumed the animal using an aspirator (Heavy Duty Hand-Held Vac/Aspirator #2820GA by BioQuip Products Inc., <http://www.bioquip.com>) for 10 min (5 min to the upper part, from the nostrils to the tail limited by the line breast-quarter, and 5 min to the lower part, down to the line breast-quarter; the part first vacuumed was alternatively the upper and the lower part). Both sides of the sheep were completely vacuumed. Then, an additional 10 min exposure period started.

A sticky cover trap (SCT) was also developed as a new host-baited collection method. Different adhesive products were tested on a white mosquito net of fiberglass (1 mm² mesh size) for their ability to capture insects and to keep them in good condition for identification. According to the number and size of collected insects and the facility of removing and identifying them, petroleum jelly (Transgel 110[®] AIGLON S.A.) was preferred to glue, or oil as an adhesive. This product was still sticky after several hours of exposure. Thereafter, to the panels were fitted directly onto a sheep. A mosquito netting cover was subdivided into several body parts (back, belly/flank, head, and legs) to identify the landing zones. The cover was held down on the sheep by tape

and coated by a thin layer of petroleum jelly. The sheep was then allowed to move freely within the pen during each evening experiment without any human interference. At the end of the exposure period, the sticky cover was cut off carefully according to the defined body parts. *Culicoides* were then carefully removed using a paintbrush dipped in clean engine oil to dilute petroleum jelly.

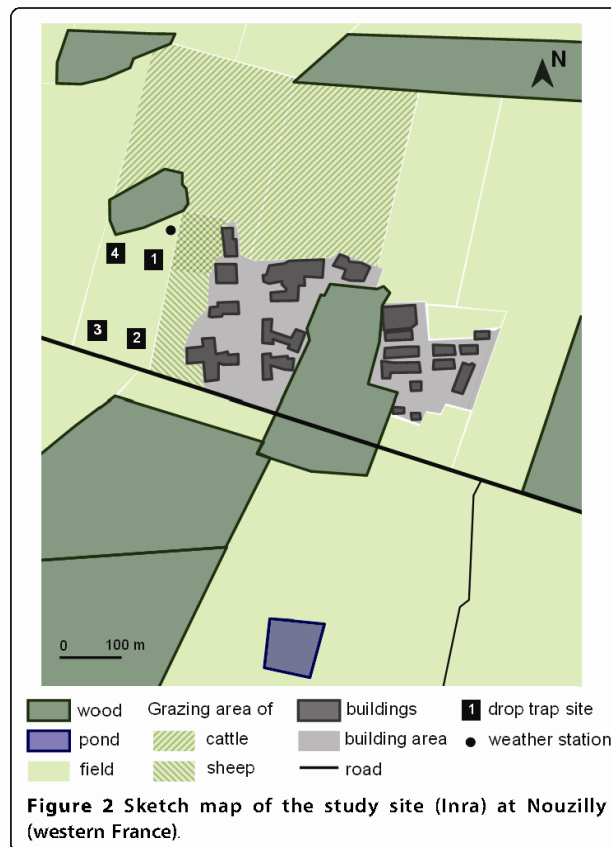
We compared these host-baited traps to a UV-light/suction trap (OVI) manufactured by the Onderstepoort veterinary institute (South Africa) [14]. This trap is equipped with an 8-W UV light tube and a downdraft suction motor ended by a plastic beaker containing a drop of soap in water. It was operated with a 12-volt car battery and placed at 1.5 m height from the ground on the cage where a single sheep was present.

Study site and procedure of trap comparison

Trap comparisons were conducted over 12 days from the 11th June to 13th July 2009 (a seasonally favorable period for *Culicoides* diversity and abundance in western France) on an experimental farm (Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, UE1277 PFIE) breeding sheep and dairy cattle at Nouzilly (47°33'01"N; 00°47'52"E; western France). Four sites were designated in the field surrounded by two grazing sheep herds (10 ewes and 20 rams close to the site 2), by grazing cattle herds (10 to 20 Holstein-Friesians heifers) and by dairy/sheep holding (< 150 m) (Figure 2). Designated sampling sites were separated by 50 m to minimize interference between traps.

Traps were compared using a 4 × 4 Latin square design, replicated 3 times. Each trap was randomly assigned to a site for the first collection evening. Then, random assignation was repeated the next three evenings with the condition that traps should be assigned to a different site each collection. Assignment procedure was repeated independently for each replicate. All collections were started and stopped 1h45 before and after the sunset (3.5 hours of collection around sunset).

Six south-Prealpes female sheep were separated into two groups. They were about 6 years old, 50-kg live weight and shorn three weeks before the experimentation began. One group was assigned to the sticky cover trap to avoid that residual petroleum jelly on sheep, which could alter results when used in another treatment. In this group, one animal was randomly chosen for each collection day and was cleaned up with a shedding blade after each experiment. In the other group, all animals were randomly assigned to a given treatment to avoid potential individual sheep effects. Each protocol step was conducted with respect to the standard ethical rules (staff was qualified for animal experimentation, premises are licensed for experiment, protocol



procedure does not cause any pain (no injection, no biological sample, no surgery)).

Meteorological conditions (air temperature, wind speed and direction, relative humidity and rainfall) were recorded every fifteen minutes using a weather station Vantage Pro 2 (Davis Instruments France, <http://www.davis-meteo.com>) situated close to the traps (Figure 2). To prevent the drop net from tearing away and to protect the animals, experiments were stopped or cancelled when wind speed was higher than 8.5 m/s or when heavy rain disrupted operation of the drop trap. Monthly meteorological data recorded by national weather station (Météo France) at Parçay-Meslay (47°26'36"N; 00°43'36"E; 13 km from the study site) in 2009 and from 1971 to 2000 were compared to illustrate meteorological conditions during the year of collections.

Culicoides identification

After captures, collection cups from drop trap and direct aspiration were stored at -20 °C overnight to kill insects. *Culicoides* collected from sticky cover trap were stored in engine oil. The insects collected with the UV-light/suction trap were stored in 70% ethanol. All *Culicoides* were morphologically identified under a

stereomicroscope (Stemi 2000C ZEISS) to species level based on identification key for the Palaearctic region [15] and sorted by sex. Females were classified as nulliparous, parous [16], freshly blood-fed and gravid. When morphological identification with stereomicroscope was not possible, individuals were dissected and identified using microscopic slide preparations (ZEISS imager A.1 fluorescence microscope).

All individuals identified as belonging to the *Obsoletus* Group (*C. chiopterus*, *Culicoides dewulfi* Goetghebuer, *C. obsoletus* and *Culicoides scoticus* Downes & Kettle) were molecularly confirmed and identified following the assay developed by Nolan *et al.* [17] including primers for these four species. Genomic DNA was extracted from individual midges using Chelex resin (50 µL/*Culicoides*) [18]. Primers and PCR amplifications conditions were as described by Nolan *et al.* [17]. Different preliminary tests were made before the start of collections to check the efficiency of the molecular assay on *Culicoides* collected through petroleum jelly and engine oil. Briefly, DNA extraction and PCR amplifications were carried out on two individuals kept in (i) petroleum jelly, (ii) engine oil, with and without a cleaning step before DNA extraction. Finally, prior to DNA extraction with Chelex resin, these *Culicoides* were individually cleaned on absorbent paper, followed by soapy water, rinsed twice in purified water, and dried on paper towel. We identified molecularly the origin of blood-meals of 45 engorged females randomly sampled in drop trap and direct aspiration collections at different collection dates. The aim was to confirm that they had fed on the bait animals. Primers and PCR conditions were as described by Garros *et al.* [19].

Statistical analysis

We compared the number of *Culicoides* females and their parity rate (proportion of parous females per collection) between traps. Exposure periods differed between traps (3 × 10 min for DA, 2 × 10 min for DT, 1 × 60 min for OVI and SCT during one hour). We assumed that *Culicoides* attracted to bait remained in the vicinity of the drop trap outside the exposure period and that some *Culicoides* remained attracted by the bait during the direct aspiration period. Thus, we did not correct the data and compared the biting rate assessed by operating each method during a given period (here 3.5 hours). For plotting, abundance data were $\log_e(n + 1)$ transformed to limit the overwriting of some points by high values. For analysis, we used untransformed abundance data.

Data were modeled using a Poisson mixed model for abundance data of dominant species, and a Binomial mixed model for parity rates of all species [20]. Capture date and site were the crossed random effects and trap

was the fixed effect. However, exploratory analysis revealed an excess of zeros with respect to a Poisson distribution in abundance data for minor species. For these species the counts were analyzed using the so-called Hurdle model to model the counts [21,22]. The Hurdle model has two components: (i) a truncated count component (Poisson regression model) was used for counts > 0, and (ii) a hurdle component modeled zero vs. larger counts (binomial regression model). Date and site effects were left in the residual variance.

Predicted values were plotted against observed counts to assess model goodness of fit. Cook's distance was used to detect influential observations [23]. For comparisons of trap effects, Wald tests were used together with Holm's *p*-value adjustment for multiple comparisons ($\alpha = 0.05$). On some occasions, when the fitted probabilities are close to zero, the Wald test may give unreliable results [24]. It was the case for species of low abundance. To overcome this problem, we used a graphical procedure [25] ensuring that non-overlapping confidence intervals indicated significant statistical differences. For these particular situations, which corresponded to cases of excess of zero, we simply gave the lowest *p*-value for which a difference in abundance between trap types was observed (if this *p*-value remained compatible with an acceptable primary risk, *i.e.* α close to 0.1).

Using direct aspiration and the sticky cover trap, we collected *Culicoides* by body region: upper and lower parts for direct aspiration and back, head, belly and legs for sticky cover trap. Upper part *versus* lower part in the direct aspiration and back/head *versus* belly/legs in the sticky cover trap were compared for the five most abundant species using the chi-squared test ($\alpha = 0.05$). For these species, we explored the variability of their host-seeking activity around sunset as regular collections were made using direct aspiration (10 min by each 20 min period) and drop trap (10 min by each 30 min period).

All data analyses were performed using the R statistical package [26].

Results

Climatic data

Climate in the study site was oceanic, with mean annual temperature of 11.4°C, thermal amplitude of 14.9°C and annual rainfall of 694 mm (Météo France data, 1971-2000). The year 2009 was a standard year in terms of meteorology except a slight water deficit in spring (195 mm between February and May 2009 *versus* 234 mm for the reference period) and a dry month of August (3 mm *versus* 40 mm). Due to technical problems, complete meteorological data sets were available only for 9 of 12 sunset collection periods. During these collection

days, wind was mainly oriented to northwest and southeast, with maximum speed of 4.5 m/s and no rainfall was recorded. Collections were carried out with temperatures between 12.5 and 29.5°C and humidity between 45 and 95%.

Collection data

During the 12 collection carried out around sunset, a total of 534 *Culicoides* (525 females and 9 males) belonging to 17 species were collected (Table 1). It was not possible to morphologically identify 2 damaged specimens which were recorded as *Culicoides* sp. Molecular assay confirmed morphological identification and separated sibling species for 88/90 individual from the Obsoletus Group (i.e. *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* and *C. chiopterus*). It was not possible to identify 2 individuals from the Obsoletus Complex (i.e. *C. obsoletus* and *C. scoticus*).

In total, 232 females (44% of total catch) were collected with the drop trap, 136 (26%) by the UV-light/suction trap, 83 (16%) by the sticky cover trap and 74 (14%) by direct aspiration (Table 1). Among the host-baited traps, the sticky cover trap and the direct aspiration collected approximately the same number of species (7 with SCT and 6 with DA), whereas the drop trap collected 10 different species. The UV-light/suction trap collected 15 different species, of which *Culicoides circumscriptus* Kieffer, *Culicoides shaklawensis* Khalaf, *Culicoides simulator* Edwards, *Culicoides santonicus* Callot, Kremer, Rault & Bach or *Culicoides clastrieri* Callot, Kremer & Deduit were not collected with the other traps. The log abundance of the total number of females for each species was linearly correlated with the species rank ($R^2 = 0.97$; data not shown), with *Culicoides brunnicans* Edwards being the dominant species. The same shape of log abundance by species rank was observed for all the traps ($R^2 = 0.86$ for DT, 0.75 for DA and 0.76 for OVI), except for the sticky cover trap ($R^2 = 0.51$) due to the absence of *C. obsoletus* and the scarcity of *C. dewulfi* (Table 1). The Shannon-Wiener (H) and the Simpson-Yule (D) indices confirmed these differences: i) good correspondence between indices for the total number of females collected ($H = 1.44$ and $D = 0.39$), for drop trap ($H = 1.22$ and $D = 0.46$) and for direct aspiration ($H = 1.42$ and $D = 0.31$), ii) deviance with the sticky cover trap ($H = 0.70$ and $D = 0.71$) due to the under-representation of *C. obsoletus* and *C. dewulfi*, and iii) deviance with the UV-light/suction trap ($H = 1.70$ and $D = 0.27$) due to the under-representation of *C. dewulfi* and the over-representation of *Culicoides punctatus* (Meigen) and *Culicoides achrayi* Kettle & Lawson (Table 1).

Males were collected only by the drop trap and the UV-light/suction trap, and gravid females only by the

sticky cover trap and the UV-light/suction trap (Table 1). Almost all engorged females were caught by the drop trap (70 vs. 4 by DA, 2 by SCT and 1 by OVI). We tested 44 blood-fed females (29 *C. brunnicans*, 14 *C. obsoletus* and 1 *C. scoticus*) of the 70 collected in the drop trap and 1 *C. brunnicans* of the 4 collected in the direct aspiration. All engorged females had fed on sheep except 2 *C. brunnicans* for which blood-meal origin was not identified. No blood engorged *C. dewulfi* was found, though it was the second dominant species in drop trap.

Trap comparison

The abundance of *C. brunnicans*, the dominant species, varied considerably between days (Figure 3A). Abundance of *C. brunnicans* and of other *Culicoides* species at the sites used during the studies varied (Figures 3A & 3B), suggesting an impact of available larval habitat and suitable adult resting areas.

Abundance data for *C. brunnicans* were correctly predicted with the Poisson mixed model ($R^2 = 0.98$; Figure 3C). The same applied to the Hurdle model for *C. dewulfi*, *C. scoticus* and *C. punctatus*. Poor model predictions were obtained for *C. obsoletus*. Cook's distances showed influential values for site 2 where most *C. brunnicans* were collected and for site 4 where this species was nearly absent (Figure 3D). However, this variability was far more important for dates: the 11th June recorded the highest abundance of *C. brunnicans* (Figure 3D), and the 6th, 8th and 13th the lowest abundances.

Both drop trap and sticky cover trap collected more *C. brunnicans* than the UV-light/suction trap whereas the direct aspiration was the less efficient method ($p < 0.05$) (Table 2). For other species, Wald test procedure gave unreliable results, i.e. p-values tend to 0 or 1, due to the low value of fitted probabilities [24,27]. Using the graphical procedure, differences were observed between traps for *C. obsoletus* abundance ($p = 0.13$): in positive collections, the UV-light/suction trap collected more *C. obsoletus* than drop trap or direct aspiration. It was not possible to establish differences between traps for *C. dewulfi* even if predicted abundances in positive collections were higher with the drop trap or the direct aspiration than with the UV-light/suction trap. Using graphical procedures, differences in predicted abundances were observed in positive collections for *C. scoticus* between sticky cover trap (the highest predicted abundance) and direct aspiration (the lowest) ($p = 0.13$). Finally, no between-trap difference was observed for *C. punctatus*.

The parity rate of *C. brunnicans* was higher in the UV-light/suction trap than in the host-baited traps (0.72 versus less than 0.65, $p < 0.05$) (Table 3). Parity rate of *C. obsoletus* was greater in the drop trap (0.86) than in UV-light/suction trap (0.54, $p < 0.017$) and in direct aspiration (0.86 in DT versus 0.54 in OVI and 0.41 in

Table 1 Numbers of *Culicoides* collected over 12 nights using four trapping methods

Species ¹	Total No.		Rank species		Drop trap ²				Direct aspiration				No. <i>Culicoides</i> collected with Sticky cover trap				UV-light/suction trap			
	F	M	F	M	No. F	Party	No. E	No. M	No. F	Party	No. E	No. M	No. F	Party	No. E	No. M	No. F	Party	No. E	No. M
<i>C. mannionae</i>	3	3	1	2	153	0.48	59	4	26	0.64	1	0.43	7	69	0.30	7	55	0.67	?	?
<i>C. edwardsi</i>	75				22	0.86	15		14	0.43	3			39	0.54					
<i>C. alberta</i>	46	1	2		27	0.64			14	0.42			1	1.00		4	25			1
<i>C. rostratus</i>	27	4			6	0.13	1		3	0.10			4	0.25		10	0.00			
<i>C. punctatus</i>	16				2	0.50							2	1.00		11	0.55			
<i>C. vexans</i>	15	6			9	0.89	3		2	1.00			3	1.00	2	1	1.00			
<i>C. achrocy</i>	10				2	0.50	1						1	?		?	0.57	1		2
<i>C. vittiger</i>	6	8			2	0.60			2	1.00			1	1.00		1	1.00			
<i>C. subdoleae</i>	5				5	0.60	1													
<i>C. pallidus</i>	2	1	1													2	0.50			1
<i>C. pictus</i>	1				1	1.00														
<i>C. proscriptus</i>	1																1	1.00		
<i>C. signatus</i>	1																1	1.00		
<i>C. shufeldensis</i>	1																1	1.00		1
<i>C. simulans</i>	1																1	1.00		
<i>C. imitator</i>	1																1	0.00		
<i>C. variator</i>	1																			
<i>C. variator</i>	1																			1
Osculetus Complex	2								1	1.00							1	0.00		
<i>Culex</i> sp.	2				1	0.00							1	0.00						
Total	525	9			232		70	4	74		4	83	2	8	136	1	4	1	4	5

¹ For the sake of clarity, 0 were not quoted.

² F: females; M: males; E: engorged; G: gravid; Party rate is No. parous/No. females.

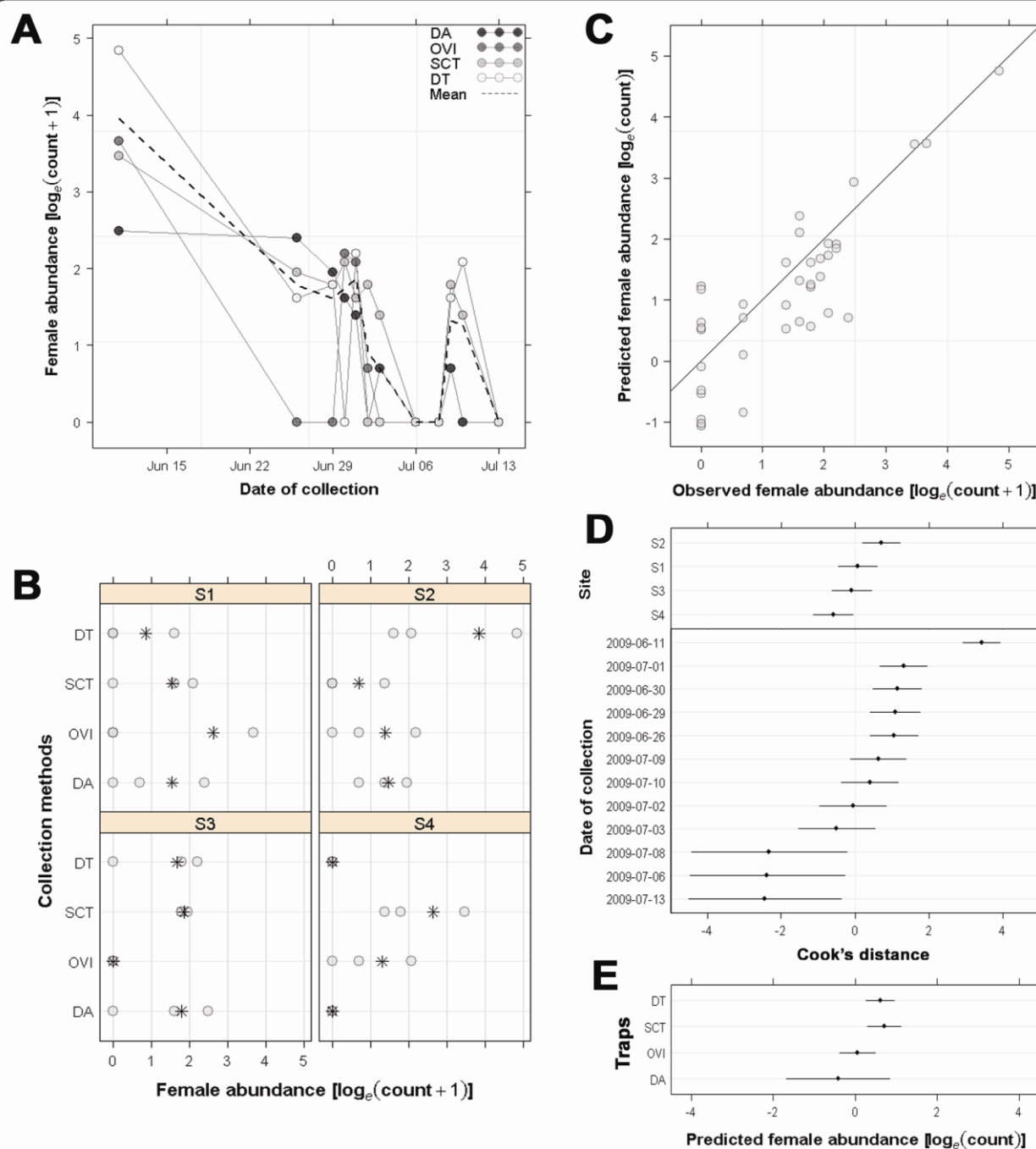


Figure 3 Graphical exploration of *C. brunnicans* female collections: (A) daily abundance, (B) number of females collected by site and by trap, (C) predicted and observed abundances, (D) assessment of the random effects of dates and sites and (E) predicted abundances by trap. NB: abundances were plotted using a \log_e scale.

Table 2 Observed and predicted biting rates per collection session

Species ¹	N	Mean No. ♀					p	Predicted No. ♀ ²				
		DT	DA	SCT	OVI			DT	DA	SCT	OVI	
<i>C. brunnicans</i>	313	12.8	3.0	5.8	4.6	< 0.05		1.9 ^a	0.7 ^b	2.0 ^a	1.1 ^c	
<i>C. obsoletus</i>	75	2.8	2.8	-	4.9	< 0.13		2.5 ^a	2.6 ^a	-	4.8 ^b	
<i>C. dewulfi</i>	46	3.9	2.0	1.0	1.3	-		3.8	1.6	-	0.6	
<i>C. scoticus</i>	27	2.0	1.7	4.0	3.3	< 0.13		1.6 ^{ab}	1.1 ^b	3.9 ^a	3.2 ^{ab}	
<i>C. punctatus</i>	16	2.0	-	3.0	1.8	-		1.6	-	2.8	1.4	

¹ Data correspond to number of females per collection for *C. brunnicans* and to number of females per positive collection for the other species

² Different letters mean difference between traps in predicted number of females with the given p-value using the Wald test procedure for *C. brunnicans* and the graphical procedure for other species

SCT, $p < 0.05$). Finally, the low number of *C. punctatus* females did not allow us to compare parity rates between traps.

Preferential landing sites and circadian rhythm

By direct aspiration, we collected 57% of the females on the upper part of sheep and using the sticky cover trap 45% on the upper part (back and head). *Culicoides brunnicans* seemed to attack indifferently upper and lower parts of animal (Figure 4, $p = 0.2$ for DA and $p = 0.9$ for SCT). *Culicoides dewulfi* attacked the upper parts of the animal preferentially ($p < 0.001$ for DA), whereas *C. obsoletus* was more abundant on lower parts ($p < 0.05$ for DA). However, counts for both these species were relatively small limiting the generalization of these observations. Counts in other species were too small to highlight differences in attack zones (Figure 4).

All *Culicoides* captured in the study exhibited a peak in activity cycle shortly before dusk (Figure 5).

Discussion

This study has demonstrated for the first time that *C. brunnicans* can be present in substantial numbers on

sheep and exceed the abundance of other commonly found *Culicoides* implicated in BTV within this region. In northern Europe, the most common species collected on livestock belong to the subgenus *Avaritia*: *C. obsoletus* and *C. dewulfi* on cattle [8,10], *C. obsoletus* on horses [9,11] and *C. obsoletus* and *C. chiopterus* on sheep [12]. All these species are suspected to be BTV8 vectors due to i) their abundance and their ability to bite ruminants, notably in absence of *C. imicola* [28], ii) the identification of BTV from field-collected individuals [29-31] and iii) for *C. obsoletus* and *C. scoticus*, their ability to be infected with BTV [5,32,33]. *Culicoides brunnicans* breeding sites are not clearly identified [34] but could include grasslands and, to a lesser extent, forests and wet areas (Delécolle, unpublished data). The high abundance of *C. brunnicans* may be related to the surrounding environment, which consisted primarily of pastures favorable to the species. *Culicoides brunnicans* is described as widely distributed in the western Palaearctic region [34]. Based on the French vector surveillance network, this species was collected in 73 out of 160 sites throughout the country. In these sites its abundance is usually very low: (1% of the total catch only in 23 sites) but locally abundant with an abundance reaching 10 to 13% of the total collection [35]. Little attention, however, has been paid to this species with respect to BTV transmission, despite its possible local abundance [36].

The risk of virus transmission is dependent, amongst other factors, on both biting rate and parity rate, a rough indicator of population survival [37-39]. Therefore, accurate and unbiased estimates of these parameters are essential for epidemiological modeling. However, collecting biting midges on animals is challenging, and *Culicoides* abundance may vary greatly between habitats [40]. In a given environment, flight activity will be greatly impacted by daily meteorological conditions, especially temperature, air humidity, light intensity or wind speed [12]. Moreover, host-seeking female distribution could be structured at a very fine scale [41], due to influence of host presence and abundance [42], or nearby environment [43,44]. Indeed, site 2 recorded the highest abundance of *C. brunnicans* probably because it was the nearest trap to the grazing sheep herd. For other, less abundant *Culicoides* species, the use of a single animal to bait traps may have limited the number of *Culicoides* caught [42]. Finally, observed parity rates were all rather high. It could mean that collections occurred at the end of the spring *Culicoides* activity peak and before the start of summer emergence of most species. This may lead to the low abundance recorded even if collections were carried out in temperature ranges compatible with *Culicoides* activity [45].

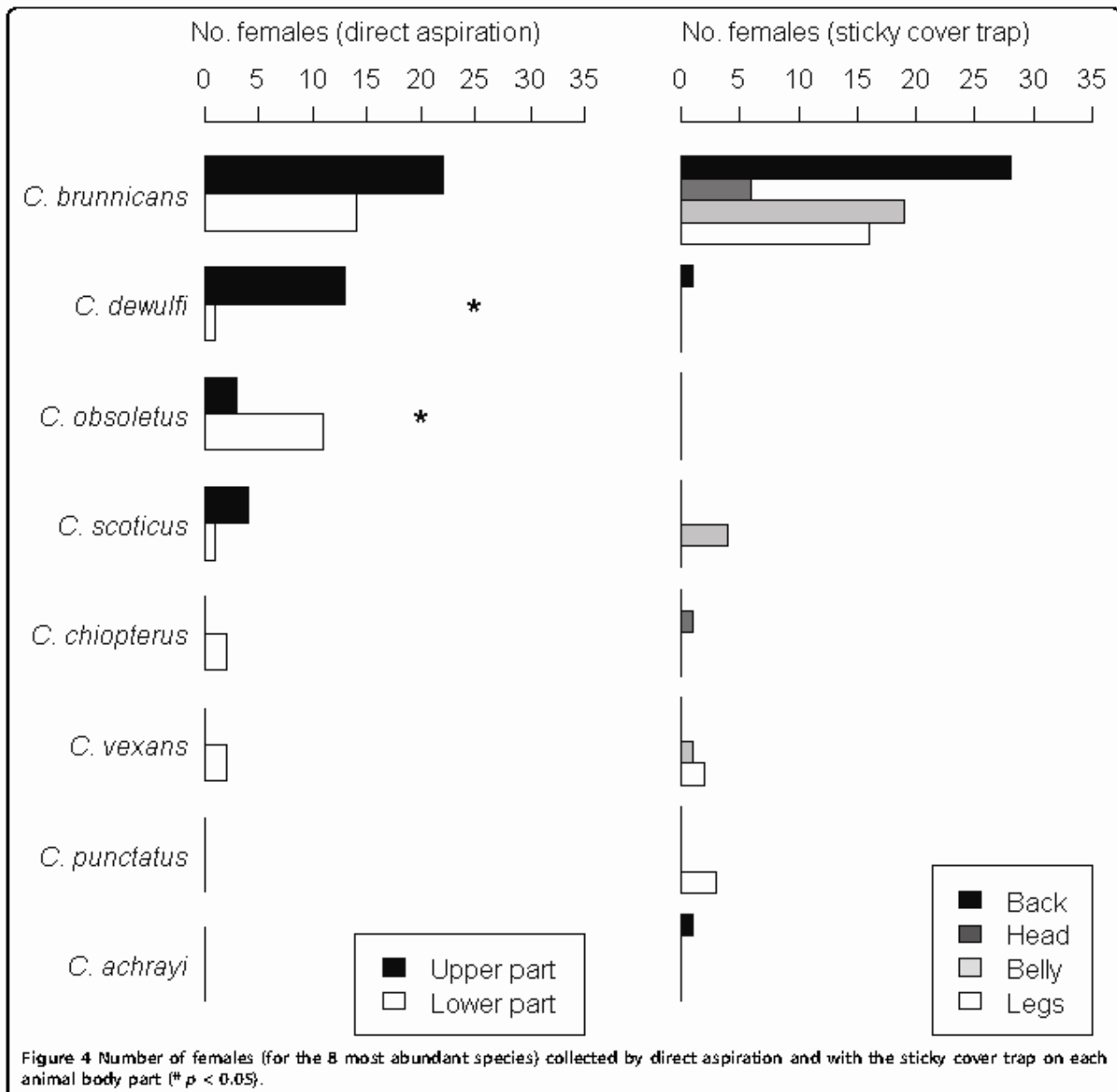
Direct aspiration was the only collection method which did not collect male or gravid females, suggesting

Table 3 Observed and predicted parity rate per collection session

Species	N	Observed parity rate					Predicted parity rate ¹				
		DT	DA	SCT	OVI		DT	DA	SCT	OVI	
<i>C. brunnicans</i>	313	0.47	0.69	0.39	0.67		0.51 ^a	0.65 ^a	0.42 ^a	0.72 ^b	
<i>C. obsoletus</i>	75	0.86	0.43	-	0.54		0.86 ^a	0.41 ^b	-	0.54 ^b	
<i>C. dewulfi</i>	46	0.44	0.43	1.00 ²	0.25		0.45	0.45	1.00	0.24	
<i>C. scoticus</i>	27	0.12	0.40	0.25	0.00		0.12	0.40	0.25	0.00	
<i>C. punctatus</i>	16	0.50	-	1.00	0.54		0.50	-	1.00	0.54	

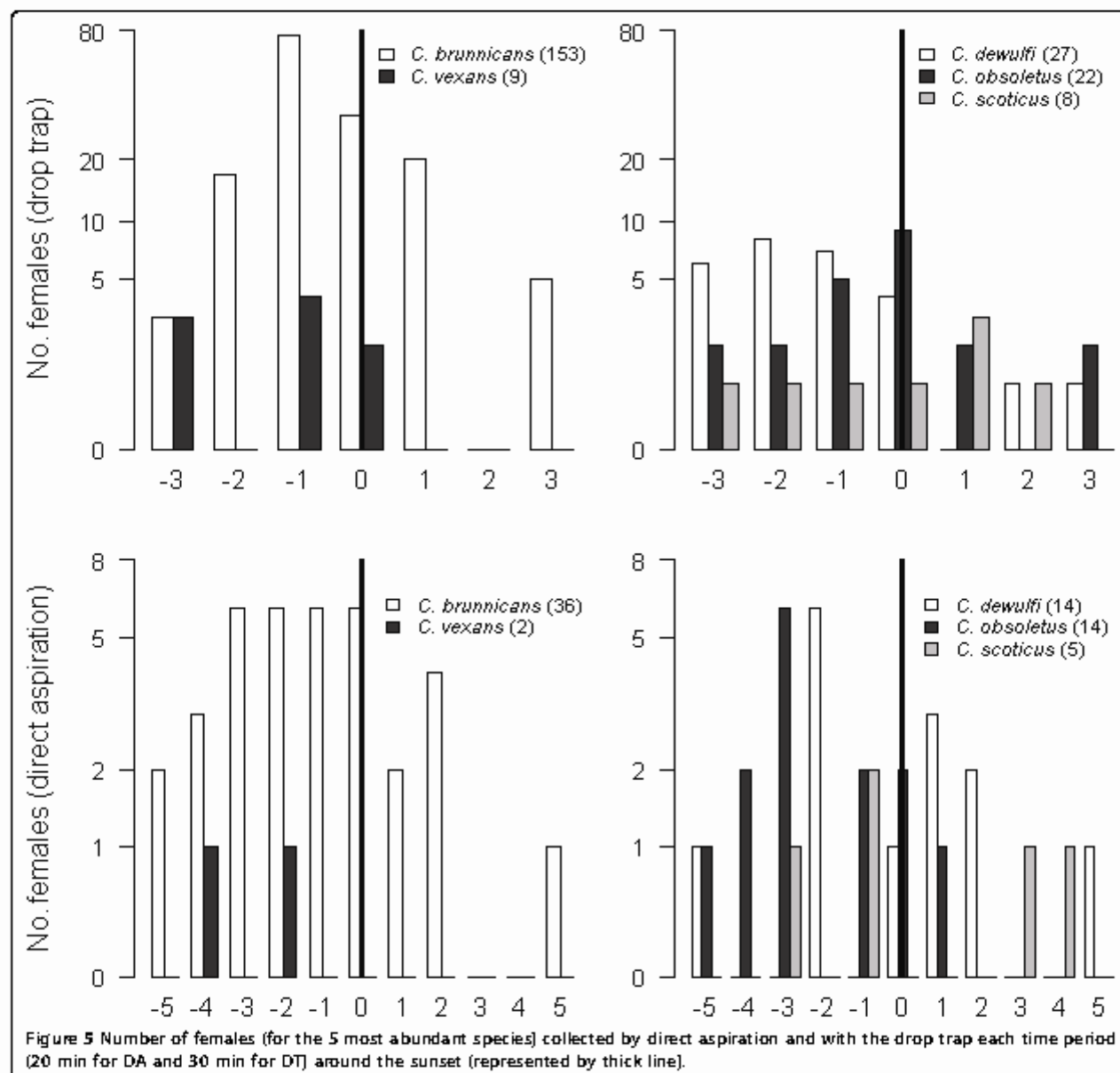
¹ Different letters mean difference between traps in predicted number of females for $\alpha = 0.05$

² Only *C. dewulfi* parous female was collected with the sticky cover trap



that only host-seeking females were collected. This method collected fewer or equivalent numbers of females *versus* other host-baited traps, suggesting that human presence and activity during 10 min of aspiration may disturb host-seeking activity. Except for *C. scoticus*, the drop trap was the host-baited trap which collected the highest number of females. There were few males in the collections (due to the drop trap sampling air space near the host). This drop trap therefore does not strictly collect only host-seeking females, although they are most likely dominant among *Culicoides* collected in the

vicinity of the host. There was also a higher proportion of parous *C. obsoletus* females compared to other traps. It is possible that the visual aspects of the drop trap (tall trap structure and the large white surface of the net) may have some effects. For instance, male swarm occurred more or less directly above an object contrasting strongly in color and brightness with the background [46]. This may lead to a possible bias in estimating the biting rate. One advantage of the drop trap is the possibility for *Culicoides* to feed quite naturally on animal bait. No *C. dewulfi* females were found



engorged on sheep, suggesting that this species might be attracted by sheep without feeding on them. The same behavior was suggested recently for *C. chiopterus* [19], both species being recognized to be strongly associated with cattle [47]. The sticky cover trap collected the same abundance and parity rate of *C. brunnicans* than the drop trap, thus suggesting that this trap was efficient to estimate biting rate for dominant species, even if presence of gravid or engorged females may suggest that it could act as an interception trap. Surprisingly, the sticky cover trap did not collect any *C. obsoletus* and only one *C. dewulfi*. These species could attack animal parts which were not sufficiently covered by the sticky cover

(i.e. head, ears). However, we cannot exclude a repellent effect of the petroleum jelly to these species, even if it is probable that *Culicoides* could not detect the gel before entering into contact because this product does not evaporate. This trap may be improved by a better design and by using another sticky substance easier to handle than petroleum jelly.

In our study, the UV-light/suction trap under-estimated the *C. brunnicans* biting rates, whereas it seemed to over-estimate *C. obsoletus* biting rates as recorded by Carpenter *et al.* [12]. It can be in contradiction to Gerry *et al.* [13] who collected fewer *C. obsoletus* females in the UV-light/suction trap than on sheep but these

apparently contradictory findings might be explained by the very high suction rate (air flow) of the OVI relative to the CDC-type traps used by Gerry *et al.* [13,14]. This trap remains an efficient and practical tool to describe species richness in an area, but presence of males, gravid females and single specimens of species which were not collected by host-baited traps suggested that this method did not only collect host-seeking females in the UV-light/suction trap. This could undermine the assessment of BTV risk as UV-light/suction traps have been used in national surveillance networks since 2000 in south Europe and since 2008 in north and central of Europe, most *Culicoides* survey were done using UV-light/suction traps [28,48-51].

Collections by direct aspiration and sticky cover trap highlighted that *C. brunnicans* attacked all parts of the animal, whereas *C. obsoletus* seemed to attack preferentially lower parts and *C. dewulfi* the upper parts. Nielsen [8] found the same behavior for *C. obsoletus*, with nearly all individuals collected from the belly of heifers, whereas *C. chiopterus* attacked preferentially the legs. On the contrary, Townley [9], who explored the preferential landing and feeding sites of *Culicoides* on horses in Ireland, observed that the most abundant species, *C. obsoletus* and *C. dewulfi*, did not seem to have preferential landing sites whereas *C. punctatus*, *Culicoides nubilosus* (Meigen) and *Culicoides pulicaris* (Linnaeus) fed at the predilection sites of sweet itch. Preferential landing sites may differ for a same *Culicoides* species depending on the host, due to variations in hair wool density, colors and skin temperatures according to the host body parts [52].

For the first time in Europe, this study compares the ability of multiple types of host-baited traps to collect host-seeking females compared to UV-light/suction traps. We observed bias of each trapping method through *Culicoides* sampling, which highlight the relevance of each trap for different kinds of *Culicoides* ecology studies. Direct aspiration seemed to collect only host-seeking females and can be used to assess accurately *Culicoides* biting rate even if the possible disturbance of host-seeking females due to human manipulation is not clear. The sticky cover trap showed its ability to assess biting rates of abundant species. After improvements (better design of the cover or sticky substance easier to use), this method has promise to conduct easily (without human intervention) host-baited collections even if we do not have an explanation of the *C. obsoletus* absence in collections. The drop trap resulted in higher estimated *Culicoides* biting rates or numbers (including presence of males in collections, high abundance for most host-biting species). Most importantly, the main advantage of the DT is that it allows assessing the engorgement level of insects and then highlighted singular behavior as for *C. dewulfi*, which seems attracted to sheep

but unwilling to feed on them. The UV-light/suction trap is the most effective method to collect large numbers of *Culicoides* midges, for example to carry out biological studies involving live *Culicoides* midges in the absence of a colony, because it remains the easiest to use maximizing diversity in collections. However, UV-light/suction traps abundances cannot be used directly to assess *Culicoides* biting rates. Given possible environmental influences on *Culicoides* species behaviors, this study should be repeated in other ecosystems hosting other species and/or other hosts (horses, cattle) and in different climatic conditions to obtain a better understanding of the relation between biting rates and UV-light/suction trap collections. This is of significant importance for the assessment of BTV risk throughout Europe.

Acknowledgements

We are particularly grateful to the co-operators on whose premises this work was conducted. From the Plateforme d'infectiologie expérimentale (PFIE) Inra Nouzilly, we would like to thank its director B. Schwartz, and all people who gave assistance in operating traps on several nights (technicians, animal keepers, shepherds), especially P. Sarradin for his involvement in this project. This study was funded partly by CIRAD and partly by the Ministry of Agriculture, Food, Fishing and Rural Affairs. We thank Hélène Guis (CIRAD) for reading and commenting the manuscript and three anonymous reviewers who helped us to improve this paper.

Author details

¹CIRAD, UMR Contrôle des maladies, F-34398 Montpellier, France. ²INRA, UE1277 PFIE, Plate Forme d'Infectiologie Expérimentale, F-37380 Nouzilly, France. ³UdS, IPPTS, Faculté de Médecine, F-67000 Strasbourg, France. ⁴Université de Montpellier 2, ISEM équipe « Interactions », F-34000 Montpellier, France.

Authors' contributions

EV, CG and TB designed the study. EV, CG, TB, XA, LG, IR and DC carried out the experimentations. EV, RL and TB analyzed the data. EV and TB wrote the manuscript, which was revised by CG, TB, CM, and RL. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 15 April 2011 Accepted: 27 June 2011

Published: 27 June 2011

References

1. Mellor PS, Boorman J, Baylis M: *Culicoides* biting midges: Their role as arbovirus vectors. *Annu Rev Entomol* 2000, **45**:307-340.
2. Mellor PS, Carpenter S, Hamrup L, Baylis M, Mertens PPC: *Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin: History of occurrence prior to 2006*. *Prev Vet Med* 2008, **87**:4-20.
3. Mellor PS, Carpenter S, Hamrup L, Baylis M, Wilson A, Mertens PPC: *Bluetongue in Europe and the Mediterranean Basin*. In *Bluetongue*. Edited by: Mellor PS, Baylis M, Mertens PPC: Elsevier; 2009:235-264.
4. Velthuis AGJ, Saatkamp HW, Mourits MCM, de Koeijer AA, Elbers ARW: *Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 and 2007*. *Prev Vet Med* 2010, **93**:294-304.
5. Mellor PS, Carpenter S, White DM: *Bluetongue virus in the insect host*. In *Bluetongue*. Edited by: Mellor PS, Baylis M, Mertens PPC: Elsevier; 2009:295-320.
6. Silver JB, Service MW: *Sampling adults by animal bait catches and by animal-baited traps*. *Mosquito ecology field sampling methods* Dordrecht, the Netherlands: Springer; 2008, 493-675.

7. Garrett-Jones C: Prognosis for interruption of malaria transmission through assessment of the mosquito's vectorial capacity. *Nature* 1964, **204**:1173-1175.
8. Overgaard Nielsen B: Some observations on biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) attacking grazing cattle in Denmark. *Entomol Scand* 1971, **2**:94-98.
9. Townley P, Baker KP, Quinn PJ: Preferential landing and engorging sites of *Culicoides* species landing on a horse in Ireland. *Equine Vet J* 1984, **16**:117-120.
10. Olbrich S, Liebisch A: Untersuchungen zum vorkommen und zum befall mit gnitzen (Diptera: Ceratopogonidae) bei weiderindern in Norddeutschland. *Mitt Dtsch Ges Allg Angew Entomol* 1988, **6**:415-420.
11. van der Rijt R, van den Boom R, Jongema Y, van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM: *Culicoides* species attracted to horses with and without insect hypersensitivity. *Vet J* 2008, **178**:91-97.
12. Carpenter S, Szmaragd C, Barber J, Labuschagne K, Gubbins S, Mellor P: An assessment of *Culicoides* surveillance techniques in northern Europe: have we underestimated a potential bluetongue virus vector? *J Appl Ecol* 2008, **45**:1237-1245.
13. Gerry AC, Monteys VJ, Vidal JOM, Francino O, Mullens BA: Biting rates of *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) on sheep in northeastern Spain in relation to midge capture using UV light and carbon dioxide-baited traps. *J Med Entomol* 2009, **46**:615-624.
14. Venter GJ, Labuschagne K, Hermanides KG, Boikanyo SNB, Majatladi DM, Morey L: Comparison of the efficiency of five suction light traps under field conditions in South Africa for the collection of *Culicoides* species. *Vet Parasitol* 2009, **166**:299-307.
15. Delécolle J-C: Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. Thèse de Doctorat d'Université mention Sciences Université Louis Pasteur; 1985.
16. Dyce AL: The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *J Aust Entomol Soc* 1969, **8**:11-15.
17. Nolan DV, Carpenter S, Barber J, Mellor PS, Dallas JF, Mordue AJ, Piernay SB: Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Vet Microbiol* 2007, **124**:82-94.
18. Solano P, Duvallet G, Dumas V, Cuisance D, Cuny G: Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). *Acta Trop* 1997, **65**:175-180.
19. Garros C, Gardès L, Allène X, Rakotoarivony I, Viennet E, Rossi S, Balenghien T: Development of an allele-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in *Culicoides* (Ceratopogonidae: Diptera). Applications on Palaearctic biting midge species. *Infect Genet Evol* 2011, **11**:1103-1110.
20. McCullagh P, Nelder JA (Eds): *Generalized Linear Models*, Second 1989, London.
21. Ridout M, Demétrio CGB, Hinde J: Models for count data with many zeros. *International Biometric Conference; Cape Town* 1998.
22. Zeileis A, Kleiber C, Jackman S: Regression models for count data in R. *J Stat Softw* 2008, **27**.
23. Cook RD: Influential observations in linear regression. *J Am Stat Assoc* 1979, **74**:169-174.
24. Hauck WW, Donner A: Wald's test as applied to hypotheses in logit analysis. *JAMA* 1977, **82**:1110-1117.
25. Goldstein H, Healy MJR: The Graphical Presentation of a Collection of Means. *J Roy Stat Soc A Sta* 1995, **158**:175-177.
26. R: A language and environment for statistical computing. [http://cran.r-project.org/manuals.html].
27. Venables WN, Ripley BD: *Modern applied statistics with S* 2002.
28. Meiswinkel R, Baldet T, de Deken R, Takken W, Delecolle JC, Mellor PS: The 2006 outbreak of bluetongue in northern Europe - The entomological perspective. *Prev Vet Med* 2008, **87**:55-63.
29. Meiswinkel R, van Rijn P, Leijts P, Goffredo M: Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Vet Rec* 2007, **161**:564-565.
30. Dijkstra E, van der Ven UK, Meiswinkel R, Holzel DR, van Rijn PA, Meiswinkel R: *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. *Vet Rec* 2008, **162**:424-424.
31. Hoffmann B, Bauer B, Bauer C, Batza HJ, Beer M, Clausen PH, Geier M, Gethmann JM, Kiel E, Liebisch G, et al: Monitoring of Putative Vectors of Bluetongue Virus Serotype 8, Germany. *Emerg Infect Dis* 2009, **15**:1481-1484.
32. Carpenter S, Lunt HL, Arav D, Venter GJ, Mellor PS: Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *J Med Entomol* 2006, **43**:73-78.
33. Carpenter S, McArthur C, Selby R, Ward R, Nolan DV, Luntz AJM, Dallas JF, Tripet F, Mellor PS: Experimental infection studies of UK *Culicoides* species midges with bluetongue virus serotypes 8 and 9. *Vet Rec* 2008, **163**:589-592.
34. Sarto i Monteys V, Delecolle JC, Moreno-Vidal JO, Pinna M: New Records of Biting Midges of the Genus *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) for Spain and Catalonia Autonomous Community (Ne Spain), with Notes on Their Biology and Veterinary Importance. *Proc Entomol Soc Wash* 2009, **111**:714-733.
35. Balenghien T, Garros C, Mathieu B, SRM L, Allène X, Gardès L, Rakotoarivony I, Venail R, Akaddar A, Drouet M, et al: La surveillance des *Culicoides* en France. *Bulletin épidémiologique* 2010, **35**:8-9.
36. Jennings DM, Mellor PS: The vector potential of British *Culicoides* species for bluetongue virus. *Vet Microbiol* 1988, **17**:1-10.
37. Macdonald G: The analysis of infection rates in diseases in which superinfection occurs. *Trop Dis Bull* 1950, **47**:907-915.
38. Garrett-Jones C, Shidrawi GR: Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*. An exercise in epidemiological entomology. *Bull World Health Organ* 1969, **40**:531-545.
39. Service MW: A critical review of procedures for sampling populations of adult mosquitoes. *Bull Entomol Res* 1977, **67**:343-382.
40. Bishop AL, McKenzie J, Spohr LJ, Barchia IM: *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) in different farm habitats. *Aust J Zool* 1994, **42**:372-384.
41. Murray MD: Local dispersal of the biting midge *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) in south-eastern Australia. *Aust J Zool* 1987, **35**:559-573.
42. García-Saenz A, McCarter P, Baylis M: The influence of host number on the attraction of biting midges, *Culicoides* spp., to light traps. *Med Vet Entomol* 2011, **25**:113-115.
43. Barnard BJH: Some factors governing the entry of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) into stables. *Onderstepoort J Vet* 1997, **64**:227-233.
44. Baylis M, Parkin H, Kreppel K, Carpenter S, Mellor PS, McIntyre KM: Evaluation of housing as a means to protect cattle from *Culicoides* biting midges, the vectors of bluetongue virus. *Med Vet Entomol* 2010, **24**:38-45.
45. European Food Safety Authority EFSA: Bluetongue Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (Question No EFSA-Q-2007-201) adopted on 19 June 2008. *The EFSA Journal* 2008, **7**:1-70.
46. Downes JA: Observations on the swarming flight and mating of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Transactions of the Royal Entomological Society of London* 1955, **106**:213-236.
47. European Food Safety Authority EFSA: Bluetongue Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (Question No EFSA-Q-2007-201) adopted on 19 June 2008. *The EFSA Journal* 2008, **7**:1-70.
48. Calistri P, Goffredo M, Caporale V, Meiswinkel R: The distribution of *Culicoides imicola* in Italy: Application and evaluation of current Mediterranean models based on climate. *J Vet Med B* 2003, **50**:132-138.
49. Conte A, Goffredo M, Ippoliti C, Meiswinkel R: Influence of biotic and abiotic factors on the distribution and abundance of *Culicoides imicola* and the *Obsoletus* Complex in Italy. *Vet Parasitol* 2007, **150**:333-344.
50. Baldet T, Delécolle JC, Cetre-Sossah C, Mathieu B, Meiswinkel R, Gerbier G: Indoor activity of *Culicoides* associated with livestock in the bluetongue virus (BTV) affected region of Northern France during autumn 2006. *Prev Vet Med* 2008, **87**:84-97.
51. Mehlhorn H, Walldorf V, Klimpel S, Schaub G, Kiel E, Focke R, Liebisch G, Liebisch A, Werner D, Bauer C, et al: Bluetongue disease in Germany (2007-2008): monitoring of entomological aspects. *Parasitol Res* 2009, **105**:313-319.
52. Braverman Y: Preferred landing sites of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) on a horse in Israel and its relevance to summer seasonal recurrent dermatitis (sweet itch). *Equine Vet J* 1988, **20**:426-429.

doi:10.1186/1756-3305-4-119

Cite this article as: Viennet et al.: Assessment of vector/host contact: comparison of animal-baited traps and UV-light/suction trap for collecting *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of Orbiviruses. *Parasites & Vectors* 2011 **4**:119.

Discussion du chapitre 2

Cette étude s'est intéressée à comparer la diversité et l'abondance des espèces de *Culicoides* venues attaquer des moutons à l'aide de plusieurs pièges à appât et un piège à lumière ultraviolette. La principale difficulté conceptuelle pour juger des biais des différentes méthodes de capture est l'absence d'une méthode de référence, toutes ayant un dispositif expérimental pouvant attirer ou repousser les *Culicoides* : grande tente moustiquaire pour le *drop trap* ou présence humaine pour l'aspiration directe et par définition la lumière ultraviolette pour le piège lumineux. Certaines données objectives (capture de mâles ou de femelles gorgées) peuvent être utilisées pour évaluer les biais de chacune des méthodes de capture, qui ont été surtout comparées relativement les unes par rapport aux autres.

La couverture collante prédit correctement le taux de piqûre des espèces abondantes. Cependant nous avons des difficultés à expliquer l'absence de *C. obsoletus* et le seul *C. dewulfi* trouvé sur les couvertures collantes au cours des captures. Ces espèces ont pu attaquer des zones mal recouvertes par la couverture (comme la tête). Une amélioration du patron de la couverture pourrait pallier ce problème et améliorer les performances de ce piège. Par ailleurs, la principale limite de ce piège est l'utilisation de vaseline comme substance collante, qui est particulièrement peu pratique à manipuler. Avec une autre substance collante, plus facile à utiliser et à diluer, cette méthode aurait l'avantage de permettre des captures longues, sans intervention humaine avec comme seul dispositif artificiel la couverture et la substance collante.

L'aspiration directe semble capturer uniquement les femelles en recherche d'hôte et peut être utilisée pour étudier le taux de piqûre. Cependant, l'utilisation de ce piège nécessite une manipulation humaine qui certainement doit perturber l'activité des *Culicoides*. Les sessions d'aspiration auraient pu être plus espacées (toutes les 20 min) afin de diminuer l'effet de la présence humaine et de suivre les périodes d'aspiration du *drop trap*. Mais nous avons préféré maximiser le nombre d'aspirations afin d'avoir une représentation plus complète du taux de piqûre au cours du temps.

C'est le *drop trap* qui capture les abondances les plus élevées, ce qui peut laisser penser à une surestimation du taux de piqûre. Par exemple, ce piège capture également des mâles attirés soit par la structure du piège ou soit par la présence de femelles. Le *drop trap* a pour principal avantage de permettre d'estimer un taux de gorgement, alors que lors de l'aspiration directe ou avec le piège collant, les *Culicoides* sont vraisemblablement aspirés ou collés avant d'avoir entrepris un repas de sang.

Le piège à lumière ultra-violette est la méthode la plus facile d'utilisation. Elle permet de maximiser l'abondance et la diversité des *Culicoides* capturés. Néanmoins, ce piège n'est pas adapté pour estimer directement le taux de piqûre, la lumière ultra-violette n'attirant sans doute pas uniquement les femelles en recherche d'hôte et/ou les attirant différemment d'un hôte à l'autre.

Ces comparaisons ont été réalisées à l'aide d'un protocole en carré latin, notamment pour prendre en compte l'effet site, qui s'est révélé important. En effet, en une seule nuit le *drop trap* situé sur le site le plus proche du troupeau de béliers (site 2) a capturé 30 % du nombre total de *Culicoides*. Dans ce cas le *drop trap* pourrait avoir, notamment par sa structure, orienté et attiré les *Culicoides* venus attaquer le troupeau de bétail. De plus,

l'abondance de cette capture est probablement liée aussi aux conditions climatiques, qui ont dues être plus appropriées que les autres jours. En prenant en compte les conditions environnementales (température, humidité, vent et luminosité), il serait intéressant de répéter cette expérience dans d'autres écosystèmes, sur d'autres hôtes (comme les chevaux dans le cadre de la peste équine) et pendant d'autres périodes de l'année pour mieux comprendre et affiner les relations entre taux de piqure et piégeage lumineux, qui reste aujourd'hui le mode de capture le plus pratique et donc le plus utilisé.

Chapitre 3 :

**Préférences trophiques des espèces paléarctiques de
Culicoides, potentiellement impliquées dans la
transmission du virus de la fièvre catarrhale ovine en
Europe**

Introduction au chapitre 3

Dans leur ensemble, les insectes hématophages montrent une formidable diversité dans les classes et espèces d'hôtes qu'ils sélectionnent pour se gorger, à savoir hommes, mammifères domestiques et sauvages, oiseaux, reptiles, amphibiens voire même d'autres insectes, les *Culicoides* ne faisant pas exception à la règle (Laird, 1946; Mellor and McCaig, 1974; Blackwell *et al.*, 1994; Carpenter *et al.*, 2008; Gerry *et al.*, 2009; Votypka *et al.*, 2009; Linden *et al.*, 2010; Mullens *et al.*, 2010). A l'échelle de l'espèce, un insecte hématophage peut sélectionner une classe de vertébrés, et à l'intérieur de la classe, une espèce d'hôte donnée. Cette tendance à sélectionner un type d'hôte est appelée préférence trophique (Clements, 1999). La sélection d'hôte est sous influence d'un compromis entre le bénéfice obtenu en se nourrissant sur l'hôte le plus approprié et le risque de mourir lors de l'attente de cet hôte (Lyimo and Ferguson, 2009). Cette alternative peut aboutir à la sélection d'un comportement trophique spécialisé (choix pour un hôte donné ou même pour un individu donné) ou opportuniste (large panel d'hôtes). D'un point de vue théorique, un comportement opportuniste doit être sélectionné dans un environnement où les probabilités de rencontre avec les hôtes sont faibles. Ainsi l'avantage de se nourrir sur l'hôte le plus approprié ne compense plus le risque pris à attendre cet hôte : le premier hôte acceptable rencontré devient une cible. A l'inverse, un comportement spécialisé doit être sélectionné dans un environnement présentant une large possibilité de rencontre avec l'hôte le plus approprié. Ces choix théoriques d'hôtes dépendent de nombreux facteurs, vraisemblablement en interaction et variables dans le temps et l'espace qui en compliquent leur compréhension. Il peut exister en effet des facteurs spécifiques à la morphologie et physiologie de l'hôte (taille, odeur, couleur), aux comportements (mouvements de défense), à l'environnement (écosystème, disponibilité et densité de population d'hôte) (Kettle, 1962 ; Kay *et al.*, 1979 ; Blackwell *et al.*, 1994; Kelly, 2001). La taille du repas de sang dépend également de plusieurs facteurs (température ambiante, stade du cycle trophogonique, âge de l'insecte, source et historique des repas de sang). La prise d'un large repas de sang (souvent deux à trois fois le poids de l'insecte adulte) permet différents bénéfices : i) minimiser le risque de se faire écraser lors de mouvements de défense en réduisant le nombre de visites, ii) optimiser la rencontre avec l'hôte, lorsque il se fait rare, iii) éviter la perte d'énergie lors de ses diverses attaques et la concentrer sur une autre fonction (reproduction, digestion, maturation des œufs). Les insectes hématophages peuvent sélectionner leurs hôtes en fonction de la qualité de leur sang. Un changement d'hôte peut faire varier le taux de développement, la quantité du repas de sang, l'efficacité de la digestion, la longévité et la fécondité (Nelson *et al.*, 1975). Ainsi, chez les insectes présentant une « concordance gonotrophique », c'est-à-dire qui développent et pondent leurs œufs à chaque fois qu'un repas de sang a été pris (Swellengrebel, 1929), le nombre d'œufs serait directement proportionnel au volume du repas de sang (Goodschild, 1955).

Le choix d'hôte par les insectes hématophages est un facteur déterminant l'intensité de la transmission des pathogènes associés (Gubbins *et al.*, 2008). Les arbovirus profitent de la relation étroite qui s'instaure entre l'insecte hématophage et son hôte pour être transmis, de l'hôte infecté à l'insecte sain et de l'insecte infectant à l'hôte sain, à la faveur d'un repas sanguin. Définir la communauté d'hôtes des insectes hématophages est essentiel pour

identifier les espèces d'insectes et de vertébrés impliquées dans la transmission de maladies vectorielles, avec comme conséquences la possibilité d'influer sur l'intensité de la transmission en jouant sur l'abondance et la localisation des hôtes (par exemple, éloigner les porcs des habitations, hôtes amplificateurs du virus de l'encéphalite japonaise, transmis par les moustiques dont *Culex tritaeniorhynchus* Giles).

Les préférences trophiques des insectes hématophages peuvent être quantifiées soit par une approche directe comparant les abondances récoltées dans différents pièges à appât (Hair and Turner, 1968 ; Sullivan *et al.*, 1971), soit par une approche indirecte identifiant l'origine des repas de sang de femelles capturées gorgées (Murray, 1970 ; Kay *et al.*, 2007). La méthode de capture sur appât permet, par maîtrise du dispositif expérimental, de mesurer l'attractivité de l'hôte, en exposant un nombre connu d'hôtes et en quantifiant la part relative de chaque espèce d'insecte sur chacun des hôtes exposés (Balenghien *et al.*, 2011). Après correction des données brutes par un facteur prenant en compte les différences de taille des hôtes, on peut obtenir pour chaque espèce d'insecte, les probabilités de se gorger sur telle ou telle espèce d'hôte, probabilités qui sont conditionnelles à la présence de ces hôtes (Balenghien *et al.*, 2011). En revanche, cette approche ne peut pas être employée sur une large échelle, à cause de la lourdeur logistique de ce type de capture. Au contraire, l'approche indirecte par identification de l'origine du repas de sang est peu limitée par le nombre de sites étudiés, et peut donc être entreprise à grande échelle, dans la mesure où l'on dispose d'un moyen efficace pour échantillonner correctement les populations de femelles gorgées. Cependant, en l'absence d'un recensement précis des hôtes présents sur les sites d'étude, cette méthode indirecte ne donne qu'une information qualitative, c'est-à-dire la liste des hôtes sur lesquels telle espèce est capable de se gorger en conditions naturelles. Pour quantifier les préférences trophiques, il faut nécessairement recenser les hôtes présents. De plus, les biais d'échantillonnage de la population des femelles gorgées sont difficilement analysables et la principale difficulté théorique est qu'on ne peut pas savoir si les femelles identifiées comme s'étant gorgées sur une espèce d'hôte se sont chacune gorgée sur des individus différents ou sur le même individu (Balenghien *et al.*, 2011).

La plupart des études comparant l'attractivité de différents hôtes pour les *Culicoides* à l'aide de pièges à appât ont été réalisées aux Etats-Unis, soit sur des espèces nuisibles soit sur des vecteurs avérés, aucune ne portait sur des espèces paléarctiques (Hair and Turner, 1968 ; Humphreys and Turner, 1973 ; Tanner and Turner, 1974 ; Schmidtmann *et al.*, 1980; Schmidtmann *et al.*, 1980). De récentes études ont permis d'identifier l'origine du repas de sang soit en utilisant la méthode PCR (Bartsch *et al.*, 2009), soit en utilisant le séquençage et en comparant les données par homologie de séquences sous GenBank (en Allemagne, (Lassen *et al.*, 2011), en France, (Ninio *et al.*, 2010)). Cependant, ces études sont imprécises (nombre d'hôte limité ou identification au groupe et non à l'espèce (Bartsch *et al.*, 2009), prennent du temps et sont limitées par le nombre de séquences présentées sous GenBank (Ninio *et al.*, 2010; Lassen *et al.*, 2011). Nous avons donc quantifié les préférences trophiques des espèces paléarctiques de *Culicoides* en réalisant deux études.

D'une part, nous avons mené des captures sur poney, génisse, chèvre, mouton et poules équipés avec un dispositif collant pour comparer l'attractivité de ces différents hôtes pour les espèces de *Culicoides* paléarctiques. Nous avons utilisé un protocole en carré latin (5 hôtes x

5 sites avec 3 réplicats) pour prendre en compte l'effet potentiel du site de capture. L'abondance (brute, puis corrigée par des facteurs liés à la taille des hôtes) a été modélisée en utilisant un modèle linéaire généralisé mixte avec l'hôte comme effet fixe et la session de capture et le site comme effets aléatoires. Cette analyse nous a permis de quantifier les préférences trophiques des espèces principales et d'en inférer leur capacité à transmettre un pathogène entre individus d'une même espèce ou entre individus de deux espèces différentes dans différents contextes d'abondance d'hôtes. De plus, nous avons pu observer les zones d'attaques des principales espèces de *Culicoides* capturées et comparer les taux de pique mesurés aux abondances estimées grâce à un piège lumineux. Les résultats de cette étude font l'objet d'une publication qui sera très prochainement soumise dans le journal *Medical and Veterinary Entomology*.

D'autre part, nous avons identifié l'origine du repas de sang de femelles capturées dans cinq élevages multi-hôtes (répartis entre les Pyrénées-Atlantiques et l'Ile-et-Vilaine) pour valider une méthode d'amplification multiplexée espèce-spécifique. A une échelle nationale, nous avons ainsi identifié des espèces au comportement opportuniste, se gorgeant sur les hôtes majoritaires de l'exploitation et une espèce au comportement spécialisé, puisque gorgée sur des hôtes qui n'étaient pas présents sur le lieu de capture. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans *Infection, Genetics and Evolution*, dont je suis co-auteur.

Host preferences of Palaearctic *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): implications for *Orbivirus* transmission

ELVINA VIENNET¹, CLAIRE GARROS¹, LAETITIA GARDÈS¹, IGNACE RAKOTOARIVONY¹, XAVIER ALLÈNE¹, RENAUD LANCELOT¹, DIDIER CROCHET², CATHERINE MOULIA³, THIERRY BALDET¹, THOMAS BALENGHIEN¹

¹CIRAD, UMR Contrôle des maladies, F-34398 Montpellier, France

²INRA, UE1277 PFIE, Plate Forme d'Infectiologie Expérimentale, F-37380 Nouzilly, France

³Université de Montpellier 2, ISEM équipe « Interactions », F-34000 Montpellier, France

Corresponding authors, e-mail: elvina.viennet@cirad.fr or thomas.balenghien@cirad.fr

ABSTRACT

The biology of free-living hematophagous insects is punctuated by periodic blood feeding times and its corollary: finding a host. Feeding success depends on host availability, host defense reactions and host preferences. Host choice is a critical determinant of the transmission intensity of pathogens.

Our aim was to describe host preferences of Palaearctic *Culicoides* species, major biting pest and arbovirus vectors, using animal-baited traps on five different host species: poultry, horse, as African horse sickness virus host, and cattle, sheep and goat, as bluetongue virus hosts. Collections were carried out from 3 hours before sunset till 3 hours after sunrise in July/August 2009 in western France with 3 replicates of a 5 sites \times 5 hosts randomized Latin square.

A total of 660 *Culicoides* belonging to 12 species, mainly *Culicoides scoticus* Downes and Kettle, *Culicoides dewulfi* Goetghebuer and *Culicoides obsoletus* (Meigen), was collected on animal baits. Abundance was maximal for the horse (95% of the total caught with 10 species). The horse, the largest bait, was the most attractive host, even when abundance data were corrected by weight, body surface or Kleiber's scaling factor. *Culicoides obsoletus* was the only dominant species attracted by birds. Both *C. scoticus* and *C. dewulfi* were collected mainly on upper parts of the horse.

The quantification of host preferences allowed us to discuss implications for transmission of *Culicoides*-borne pathogens such as bluetongue virus. Finally, operating of UV-light/suction trap during host-baited collections allowed us to correlate *C. scoticus* and *C. obsoletus* biting rates and UV-light/suction trap catches. The establishment of this relation generates conversion factors to apply on light trap catches commonly used across surveillance networks to assess *Culicoides* population abundance on a larger scale.

KEY WORDS: *Culicoides*, host preference, bluetongue, African horse sickness, Western Europe

Introduction

Insects exhibit diverse resource-exploitation strategies including predation, herbivory, parasitism or hematophagy. This latter originated independently at different geological times in different taxa including both parasitic insects and free living forms (Balashov, 1999). Acquiring hematophagy means that hematophagous insects become potential biting pests to vertebrates, and potential vectors of pathogens among vertebrate populations. The evolution of hematophagy has resulted in 3 main ecological trends: ectoparasitism, parasitism in nests and shelters, and repeated blood meals on hosts outside shelters (Balashov, 1999). The biology of the third hematophagous insect group (most of dipterans) is punctuated by periodic blood meals and its corollary: finding a host. Feeding success on a given host depends on host availability, host defense reactions and host preferences. Host preference can be defined as the tendency for the insect to select a class of vertebrates or a given host species (Balenghien *et al.*, 2011). Host choice is the result of a trade-off between the advantage of waiting for an optimal host and the risk of death before feeding, which therefore selects opportunistic or specialized feeding behaviors (Lyimo and Ferguson, 2009). Moreover, host choice is a crucial determinant of the transmission intensity of pathogens. Specialist behavior may be associated with an optimal transmission in one-host species populations whereas opportunist behavior may allow transmission between different host species (“bridge vectors”) or lead to a dilution effect (Schmidt and Ostfeld, 2001; Balenghien *et al.*, 2011).

Biting midges (Ceratopogonidae) are probably the most ancient blood-sucking dipterian hematophagous group, as earliest fossils are dated by Lower Cretaceous (Balashov, 1999). Nowadays, *Culicoides* are an important biting nuisance to humans and animals, causing acute allergic dermatitis in horses, and also transmitting parasites and viruses to a large host range including humans, domestic and wild mammals or birds (Mellor *et al.*, 2000). *Culicoides* are chiefly known as transmitters of 2 viruses of animals: the African horse sickness and the bluetongue viruses (AHSV and BTV) and more generally of Orbivirus, which cause devastating diseases of international significance that they have to be notified to OIE (Mellor *et al.*, 2000). AHSV can affect different equid species and, mortality rates frequently exceed 90% in horses (Mellor *et al.*, 2000). BTV is thought to infect all known species of ruminant, but severe disease usually occurs only in certain breeds of sheep and some species of deer (Mellor *et al.*, 2000). *Culicoides imicola* Kieffer is considered as the major field AHSV and BTV vector in Africa, in the Mediterranean basin and in the Middle East (Mellor *et al.*, 2000), illustrating its ability to feed on a large range of hosts. From 2006 to 2008, the emergence and intense transmission of serotype 8 of bluetongue virus in northern Europe had disastrous sanitary and economical consequences (Wilson and Mellor, 2009; Velthuis *et al.*, 2010) and highlighted the importance to quantify the host preferences of *Culicoides*, as key parameter in BTV transmission (Gubbins *et al.*, 2008).

Host-feeding pattern of *Culicoides* were investigated mostly with blood-meal identification using serological or molecular assays (Murray, 1970; Blackwell *et al.*, 1994; Garros *et al.*, 2011), mainly because of the difficulty to collect *Culicoides* directly on animals due to their small size. Some *Culicoides* species are attracted and feed on both mammal and avian hosts (Hair and Turner, 1968; Tanner and Turner, 1974; Votykka *et al.*, 2009), e.g.

Culicoides obsoletus (Meigen), *Culicoides scoticus* Downes and Kettle or *Culicoides chiopterus* (Meigen) found engorged in both mammals and birds (Lassen *et al.*, 2011). Some other *Culicoides* species may be classified mainly as primary bird or mammal biters (Nevill and Anderson, 1972; Walker and Boreham, 1976). Inside a given vertebrate class, most *Culicoides* species seem to be able to engorge on different host species, as for instance, at least cattle, sheep and horse for *C. imicola* (Braverman *et al.*, 1971; Nevill and Anderson, 1972), at least cattle and leporids for individuals from the Variipennis Complex (Tempelis and Nelson, 1971), at least cattle, sheep, deer and humans for *Culicoides impunctatus* Goetghebuer (Blackwell *et al.*, 1994), and at least cattle, sheep, horse and rabbits for *C. obsoletus* and *C. scoticus* (Ninio *et al.*, 2010). To the contrary, inside a class of vertebrates, some *Culicoides* species may have a specialized feeding behaviour, as *C. chiopterus* which was found engorged on cattle even when trapped in sheep farms (Garros *et al.*, 2011). However, quantification of host preferences was usually not possible from these studies, mainly because of the absence of enumeration of available hosts (Balenghien *et al.*, 2011).

Our aim was to quantify host preferences of Palaearctic *Culicoides* using host-baited trap collections. Although regularly used for *Culicoides* studies in North-America (Hair and Turner, 1968; Humphreys and Turner, 1973; Tanner and Turner, 1974; Schmidtman *et al.*, 1980; Raich *et al.*, 1997), this methodology has never been used for Palaearctic *Culicoides* species, though it is easier and rigorous to analyse data from host-baited trap collections than from blood-meal identifications: less hypotheses on blood-meal distribution in host populations are necessary for the first method (Balenghien *et al.*, 2011). Finally, we discussed implications of host preferences for *Orbivirus* transmission in livestock.

Materials and Methods

Study sites and host-baited collections. Host preference studies were conducted from 15th July to 6th August 2009 on an experimental farm (Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, UE1277 PFIE) breeding sheep and dairy cattle at Nouzilly (47°33'01''N; 00°47'55''E) in western France. Five sites were delimited in a field close to grazing cattle (10 to 20 Holstein-Friesians heifers) and sheep (10 ewes and 20 rams) herds and close to dairy/sheep holdings (< 100 m) (Fig. 1). Each site was distant ca. 50 m from each other to avoid any interference on their respective catches. During collections, meteorological conditions (air temperature, relative humidity, rainfall, wind speed and direction) were recorded every 15 minutes using a weather station Vantage Pro 2 (Davis Instruments France, www.davis-meteo.com) situated close to the traps (Fig. 1). Experiments were cancelled during adverse weather forecast (heavy rain, thunderstorm). Monthly meteorological data recorded by national weather station (Météo France) at Parçay-Meslay (47°26'36''N; 00°43'36''E; 13 km from the study site) in 2009 were used to illustrate meteorological conditions the year of collections.

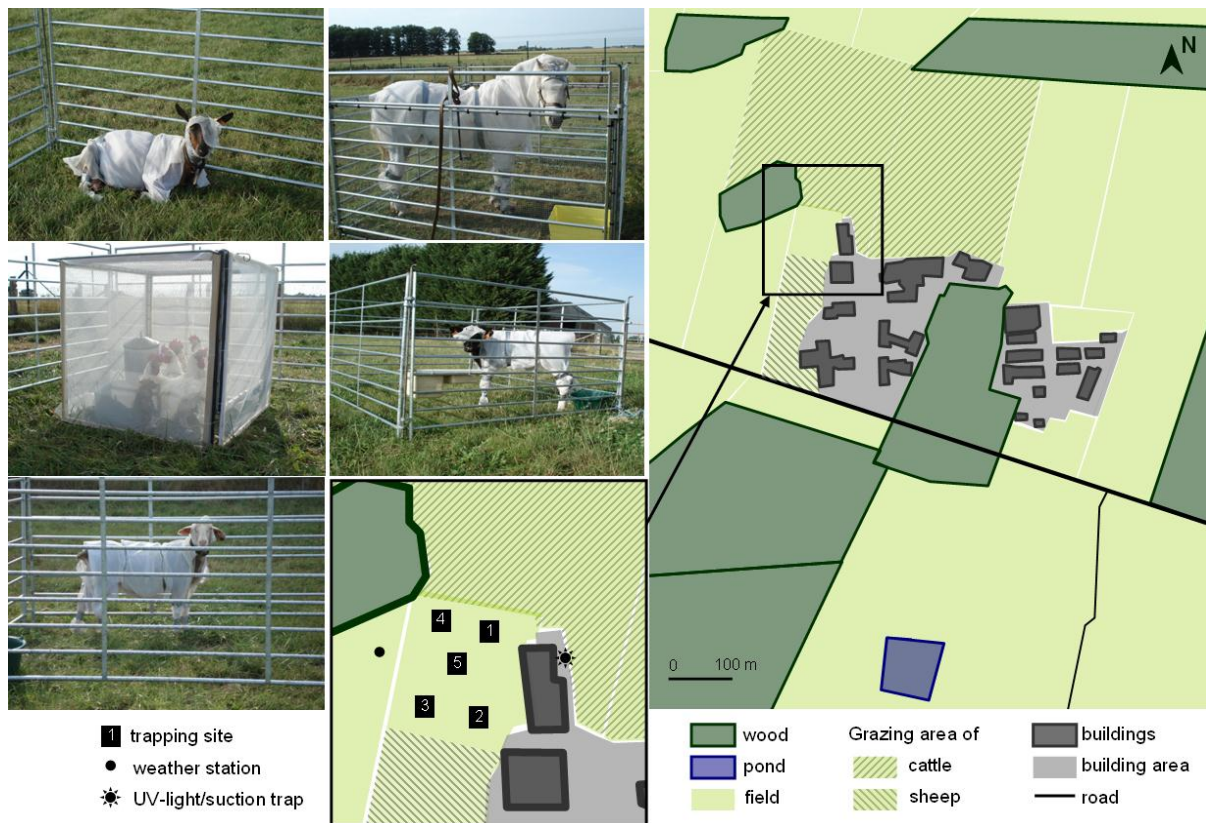


Figure 1: Sketch map of the study site at Nouzilly (western France) with the five hosts wearing sticky covers for comparison during 15 days following a 5 x 5 Latin square design.

To separate ornithophilic from mammophilic species, we used host-baited traps with chicken and mammals, including horse, as potential AHSV host, and cattle, sheep and goat, as potential BTV hosts. A 10 years old, 275 kg live weight Welsh pony mare (*Equus caballus*), a 2 years old, 50 kg South-prealpes ewe (*Ovis aries*), a 5 years old, 45 kg Alpine goat (*Capra aegagrus*), a 2 months, 77 kg Prim'holstein heifer (*Bos taurus*) and 5 White Leghorn hens (*Gallus gallus*) of 2 kg each were used as baits. For each collection day, non-bird hosts were equipped with a sticky cover following procedures described by Viennet *et al.* (2011). The 5 hens were kept in 1 x 1 x 1 m cage, equipped with a sticky cover using a petroleum jelly (figure 1). Collections were carried out using a 5 x 5 Latin square design. Each host was randomly assigned to a site for the first collection session. The next four sessions, random assignation was repeated with the condition that each host should be attributed to all five sites in the full experimental design. Three replicates of this design were done. Each session started 3 h before the sunset and stopped 3 h after the sunrise. By the end of each collection session, covers were cut with respect to the corresponding body part: head, back, belly and legs. Thereafter, all trapped insects and other hematophagous insects were removed using a paintbrush dipped in clean engine oil to dilute petroleum jelly. Each protocol step was conducted with respect to the standard ethical rules: staff was qualified for animal experiments, premises were licensed for animal experiments, protocol procedure did not cause any pain to animal baits, *i.e.* no injection, no biological sample, no surgery, and these animal baits were not more exposed to insect bites than other animals present in the farm.

In parallel, a UV-light/suction trap (manufactured by the Onderstepoort veterinary institute in South Africa) was operated during each collection session to have an overview of the *Culicoides* diversity. It was running with an 8W UV light tube and on a 12-volt car battery and placed at 1.5 m height from the ground on a tree invisible from the animal-bait locations (figure 1). The insects collected with the UV-light/suction trap were stored in 70% ethanol.

***Culicoides* identification.** All *Culicoides* were morphologically identified under a stereomicroscope (Stemi 2000C ZEISS) to the species level based on identification key for the Palaearctic region (Delécolle, 1985) and sorted by sex. Females were classified as nulliparous, parous (Dyce, 1969), blood-fed and gravid. When morphological identification with stereomicroscope was not possible, individuals were dissected and identified using microscopic slide preparations (ZEISS imager A.1 fluorescence microscope).

Individuals identified as belonging to the Obsoletus Group (*C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. chiopterus*, and *Culicoides dewulfi* Goetghebuer) were molecularly confirmed or identified following the assay developed by Nolan *et al.* (2007) including primers for these four species. Genomic DNA was extracted from individual midges using Chelex resin (50 μ L/*Culicoides*) (Solano *et al.*, 1997). Primers and PCR amplifications conditions were as described by Nolan *et al.* (2007). Before DNA extraction with Chelex resin, *Culicoides* collected in sticky cover traps were individually cleaned on absorbent paper, followed by soapy water, rinsed two times in purified water, and quick-drying on paper (Viennet *et al.*, 2011).

Moreover, we molecularly identified the origin of blood-meals of all engorged females collected in animal or UV-light traps. Primers and PCR conditions were as described by Garros *et al.* (2011).

Statistical analysis. We aimed to compare host attractiveness for the most abundant *Culicoides* species. The attractiveness is known to depend on host size (Dow *et al.*, 1957; Edman *et al.*, 1972; Clements, 1999). Thus, we first compared host preference using raw abundance data. Then, we corrected data by host weight, host body surface area and host Kleiber's allometric scaling (*i.e.* the weight to the power 3/4) to obtain abundances on theoretical hosts of same live weight, same body surface area and same basal metabolism. Body surfaces were calculated using Meeh formula for the hen (Dukes, 1937), Stahl formula for pony and goat (Stahl, 1967; USEPA, 1993), Bennett formula for sheep (Bennett, 1973) and Brody formula for heifer (Berman, 2003). Abundance data were modeled using a generalized linear mixed model with host as the fixed effect, and sites and collection sessions as the crossed random effects. Wald tests were used to compare host effects two by two after Holm's adjustment of *p*-values ($\alpha = 0.05$), the null hypothesis being the equality of these effects.

The abundances of collected *Culicoides* by body part (head, back, belly and legs) were compared with the chi-squared test ($\alpha = 0.05$) to highlight differences in landing sites of *Culicoides* species. The null hypothesis was an homogeneous distribution according to the body part.

All data analyses were performed using the R statistical packages (R Development Core Team).

Implications for *Orbivirus* transmission. Host-baited trap collections allowed us to compute the conditional host preference for dominant *Culicoides* species, *i.e.* the probability for a midge to choose a given host among the five available hosts (Balenghien *et al.*, 2011). Then, we used these conditional host preferences to predict the probability for a *Culicoides* to feed twice on the same host species or to feed successively on two different host species in various contexts of host abundance, assuming independence in the choice of hosts for consecutive blood meals, *i.e.*, no learning capacity for the choice of hosts. These probabilities may be regarded as a measure of *Culicoides* species ability to transmit pathogens among one-host species population or from one host species to another one (Balenghien *et al.*, 2011). This has important implications in *Orbivirus* transmission, as cattle have been suggested as decoy hosts (Du Toit, 1962; Nevill, 1978).

Finally, we compared biting rates assessed by the host-baited trap with the abundance in UV-light collections by calculating Pearson correlation coefficients. Indeed, UV-light traps were widely used worldwide to estimate distribution and seasonal abundance of *Culicoides*. Because UV-light traps have been shown repeatedly to not correctly measure *Culicoides* biting rates (Carpenter *et al.*, 2008; Gerry *et al.*, 2009; Viennet *et al.*, 2011), modeling the relation between UV-light collections and biting rates would greatly improve the assessment of *Orbivirus* transmission risk at a wide scale.

Results

Climatic data. Study site climate was oceanic, with mean annual temperature of 11.4°C, thermal amplitude of 14.9°C and annual rainfall of 694 mm (Météo France data, 1971-2000). In 2009, annual rainfall (603 mm) was lower than for the 1971-2000 period, with a slight deficit in spring (195 mm between February and May 2009 *versus* 234 mm for the reference period) and in August (3 mm in 2009 *versus* 40 mm) and the following months (Fig. 2A). Temperatures were close to normal values in 2009.

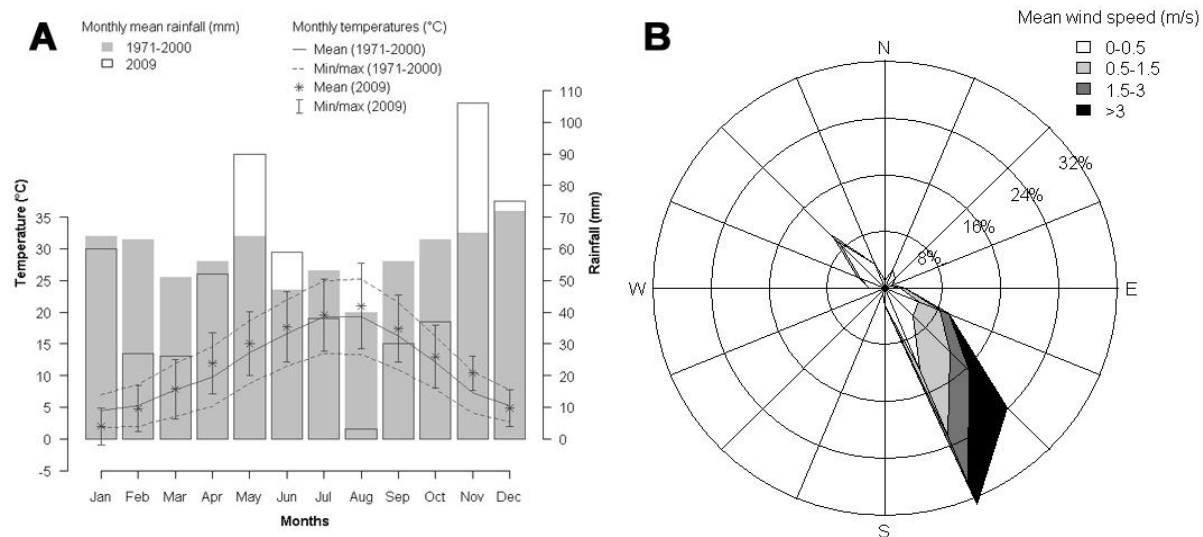


Figure 2: Climatic conditions in the study site. (A) Ombrothermic diagram for comparison between 2009 and the 1971-2000 period (Météo France data) and (B) wind rose recorded during collection sessions.

During collections, wind was mainly oriented from northwest to southeast (Fig. 2B). Only one collection session was windy (mean wind speed of 3.1 m/s), whereas others were quiet (mean wind speed < 1.8 m/s). During collections, only 2 rainfall events of 0.2 mm were recorded and temperatures were comprised between 9.3 and 30.1°C (mean daily minimum and maximum temperatures of 12.3 and 24.6 °C). Relative humidity ranged between 29 and 99% (mean daily minimum and maximum relative humidity of 47.8 and 93.9%).

Collection data. During the 15 collection sessions, a total of 660 *Culicoides* (659 females and 1 male) belonging to 12 species was collected on hosts (Table 1). Ten damaged specimens could not be identified and were recorded as *Culicoides* sp. Most of the *Culicoides* (611 females) belonged to the Obsoletus Group (i.e. *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* and *C. chiopterus*). Molecular identification assay was used to confirm morphological identification and to separate females from the Obsoletus Complex. Our sample (514 Obsoletus Group individuals) was made of by 273 *C. scoticus*, 181 *C. dewulfi*, 59 *C. obsoletus* and 1 *C. chiopterus* females. Twenty were not identified and recorded as Obsoletus Group.

In host-baited collections, 625 females belonging to 10 different species (94.8% of total catches) were collected on the mare, 14 belonging to 4 species (2.1%) on the heifer, 8 belonging to 3 species (1.2%) on the goat, 7 belonging to 4 species (1.1%) on the hen and 5 belonging to 4 species (0.8%) on the ewe (Table 1). The log abundance of the total number of females in each species was linearly correlated with the species rank ($R^2 = 0.89$; data not shown), *C. scoticus* being the dominant species. A total of 4 engorged females were collected

on the sticky covers (2 *C. obsoletus* and 1 *C. dewulfi* on the mare and 1 *C. dewulfi* on the ewe). One sample (1 *C. obsoletus*) failed to give a detectable PCR amplicon. All 3 others had fed on sheep. Other hematophagous insects were collected on hosts: *Stomoxys calcitrans* (L.) stable flies and *Culex* mosquitoes, probably *Culex pipiens* L.– individuals were too damaged to be confidently identified. Mosquitoes were collected mostly on hen-baited trap (73.7%) and stable flies were trapped mainly on mare- (42.1%), and on hen- (36.8%) and heifer-baited trap (21.1%) (Table 1).

A total of 1,227 *Culicoides* (1,151 females and 76 males) belonging to 22 species were collected in the UV-light/suction trap (Table 1). A total of 260 females identified as belonging to the Obsoletus Group (out of 1,042 captured females) were then molecularly identified: 196 *C. obsoletus*, 30 *C. scoticus*, 27 *C. dewulfi* and 27 *C. chiopterus* females. Only 2 individuals were not identified and recorded as Obsoletus Group. As for host-baited collections, individuals of the Obsoletus Group were largely dominant, but the species ranks were different, with *C. obsoletus* being the dominant species, and *C. scoticus* the third species. The log abundance of the total number of females for each species was linearly correlated with the species rank ($R^2 = 0.82$; data not shown), but with a clear over-representation of *C. obsoletus*. Some low abundant species were collected in the UV-light/suction trap, but not on the host-baited traps, and conversely (Table 1). A total of 6 engorged females (3 *C. obsoletus*, 1 *Culicoides clastrieri* Callot, Kremer and Deduit and 2 *Culicoides punctatus* Latreille) were collected in the UV-light/suction trap. Two *C. obsoletus* had fed on sheep and one *C. punctatus* on cattle. The 2 other DNA samples failed to give a detectable PCR product.

Table 1: Numbers of *Culicoides* collected over the 15 sessions on 5 different hosts using a sticky cover trap and the UV-light/suction trap

Species	Host-baited traps										UV-light/suction trap			
	Rank	All hosts		Mare ²		Ewe	Heifer	Goat	Hen		Rank	F	P	M
		F ¹	M	F	P	F	F	F	F	M				
<i>C. scoticus</i>	1	303		297	63	1	1	4			3	108	19	1
<i>C. dewulfi</i>	2	210		200 ³	49	3 ³	6	1			2	131	37	11
<i>C. obsoletus</i>	3	71	1	64 ³	53	1	1	2	3	1	1	765 ³	41	21
<i>C. punctatus</i>	4	15		15	33						4	60 ³	40	13
<i>C. chiopterus</i>	5	5		4	25				1		5	36	86	7
<i>C. subfasciipennis</i>	5	5		5	60						-			
<i>C. fasciipennis</i>	7	2		2							17			1
<i>C. minutissimus</i>	7	2					1		1		-			
<i>C. impunctatus</i>	9	1		1							-			
<i>C. lupicaris</i>	9	1		1							14	2		
<i>C. simulator</i>	9	1		1							-			
<i>C. vexans</i>	9	1							1		10	3		1
<i>C. festivipennis</i>	-										6	16 ³	62	12
<i>C. pulicaris</i>	-										7	7	14	
<i>C. brunnicans</i>	-										8	6	83	
<i>C. circumscriptus</i>	-										9	5	60	
<i>C. clastrieri</i>	-										10			4
<i>C. achrayi</i>	-										12	2		1
<i>C. picturatus</i>	-										12	2		1
<i>C. duddingstoni</i>	-										14	2		
<i>C. newsteadi</i>	-										14	2		
<i>C. alazanicus</i>	-										17			1
<i>C. cataneii</i>	-										17			1
<i>C. gejjelensis</i>	-										17			1
<i>C. kibunensis</i>	-										17	1		
<i>C. salinarius</i>	-										17	1		
Obsoletus Group	-	32		30	37		1	1			-	2		
<i>Culicoides</i> sp.	-	10		5	40		4		1		-			
TOTAL <i>Culicoides</i>		659	1	625		5	14	8	6	1		1151		76
<i>Culex</i> sp.		24		3		1	5	1	14					
<i>Stomoxys calcitrans</i>		19		8			4		7					

¹ F: females; (P): parity rate as No. parous/No. females (given if F > 5); M: males. For the sake of clarity, 0 were not quoted.

² Mare (*Equus caballus*); Ewe (*Ovis aries*); Heifer (*Bos taurus*); Goat (*Capra aegagrus*); Hen (*Gallus gallus*).

³ 1 to 3 of these females were engorged.

Host preferences. *Culicoides scoticus*, *C. dewulfi* and *C. obsoletus* were mainly attracted by the mare (Fig. 3) and secondly by the other mammal hosts. Only *C. obsoletus* seemed to be attracted by birds (Fig. 3).

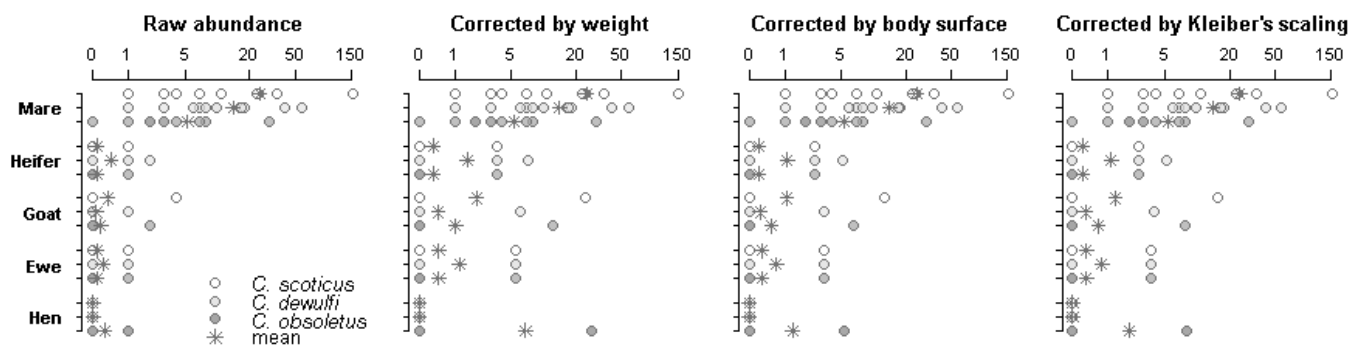


Figure 3: Number of *Culicoides scoticus*, *C. dewulfi* and *C. obsoletus* females collected by host and by collection session. Data are presented as raw abundance and then corrected by weight, by body surface area and by Kleiber's scaling factor.

All generalized linear mixed-effects models predicted correctly abundance data, with random effects (sessions and sites) showing important variations of *Culicoides* daily abundance and a very heterogeneous repartition of populations in space (data not shown). Whatever the model or the correction of data, the predicted abundance was largely higher on mare than on other host for the 3 *Culicoides* species. Among the other mammal hosts, *C. scoticus* seemed to be more attracted by the goat than by the heifer or the ewe (significance of tests depended on the correction of data), *C. dewulfi* seemed to be more attracted by the heifer than by the goat and the ewe and *C. obsoletus* seemed to be more attracted by the heifer and the goat than by the ewe. Finally, the predicted abundance on hens was null at the exception of *C. obsoletus*, the latter with a higher attraction for hens than for heifer, goat or ewe.

Table 2. Observed and predicted numbers of *Culicoides* per host and per collection session

Hosts			Observed abundance		Predicted abundance ⁴				Conditional host preference: mean [min; max]
Species	Wt ²	BSA ³	Mean	N	Raw data	After correction by BSA	Wt	KSF ⁵	
<i>C. scoticus</i>									
Mare	275	4.2	19.80	297	5.55 ^a	5.32 ^a	4.89 ^a	5.22 ^a	0.91 [0.06; 1.00]
Heifer	77	1.7	0.07	1	0.02 ^{bc}	0.04 ^b	0.04 ^b	0.03 ^b	0.00 [0.00;0.02]
Goat	50	1.3	0.27	4	0.10 ^b	0.25 ^b	0.36 ^c	0.27 ^b	0.08 [0.00;0.94]
Ewe	45	1.3	0.07	1	0.02 ^c	0.06 ^c	0.08 ^b	0.06 ^c	0.01 [0.00;0.13]
Hen ¹	2	0.8	0.00	0	0.00 ^{bc}	0.00 ^{bc}	0.00 ^{bc}	0.00 ^{bc}	0.00 [0.00;0.00]
<i>C. dewulfi</i>									
Mare	275	4.2	13.33	200	8.30 ^a	8.19 ^a	8.05 ^a	8.16 ^a	0.85 [0.46; 1.00]
Heifer	77	1.7	0.40	6	0.26 ^b	0.62 ^b	0.81 ^b	0.62 ^b	0.08 [0.00; 0.27]
Goat	50	1.3	0.07	1	0.04 ^{bc}	0.13 ^c	0.23 ^c	0.16 ^c	0.01 [0.00; 0.18]
Ewe	45	1.3	0.20	3	0.13 ^c	0.39 ^c	0.62 ^{bc}	0.42 ^c	0.06 [0.00; 0.54]
Hen ¹	2	0.8	0.00	0	0.00 ^{bc}	0.00 ^{bc}	0.00 ^{bc}	0.00 ^{bc}	0.00 [0.00; 0.00]
<i>C. obsoletus</i>									
Mare	275	4.2	4.27	64	2.07 ^a	1.86 ^a	1.16 ^a	1.72 ^a	0.65 [0.20; 1.00]
Heifer	77	1.7	0.07	1	0.04 ^{bcd}	0.08 ^b	0.06 ^b	0.07 ^b	0.04 [0.00; 0.46]
Goat	50	1.3	0.13	2	0.07 ^{bd}	0.18 ^{bd}	0.17 ^b	0.19 ^b	0.07 [0.00; 0.80]
Ewe	45	1.3	0.07	1	0.03 ^c	0.08 ^c	0.07 ^c	0.08 ^c	0.06 [0.00; 0.64]
Hen ¹	2	0.8	0.20	3	0.10 ^d	0.52 ^d	1.60 ^d	0.72 ^d	0.17 [0.00; 0.73]

¹ 5 hens were used. Weight and body surface area are given for one hen.

² Wt: Weight (kg); ³ BSA: body surface area (m²).

⁴ Different letters mean difference between hosts in predicted number of females for $\alpha = 0.05$.

⁵ KSF: Kleiber scaling factor.

Preferential landing sites. On mare (Fig. 4), we collected 68% of the 297 *C. scoticus* females on the back, 24% on the head, 6% on the legs and only 2% on the belly ($p < 0.001$). The same trend was observed for the 200 *C. dewulfi* females (respectively 60%, 24%, 10% and 7% with $p = 0.016$) whereas *C. obsoletus* did not seem to have clear preferential sites (39%, 17%, 9% and 34%, $N = 64$, $p = 0.711$).

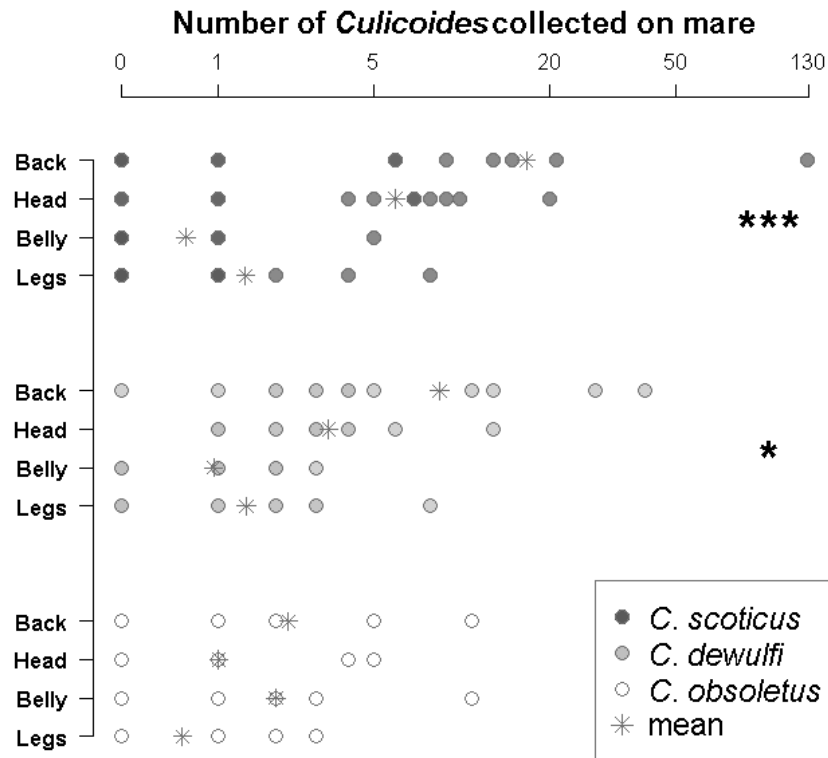


Figure 4: Number of *Culicoides* females collected on each mare body part by collection session (*** $p < 0.001$; * $p < 0.05$)

Implications for *Orbivirus* transmission. To highlight the interest to determine conditional host preferences, we simulated the probability for *C. obsoletus* to bite twice the same host species or successively two different host species in different context of sheep, cattle and horse abundances, and under the assumption of no learning capacity for *Culicoides* host choice (Fig. 5). In a simulated herd mixing sheep and 10 cattle – both hosts have the same attractiveness and an important difference of weight – *C. obsoletus* would bite mainly sheep, except in herds with low number of sheep. Feeding probability would be equally distributed in both species in a simulated herd of 100 cattle and > 200 sheep. The same figure would be observed in a herd mixing cattle and few horses – these two hosts having the same weight but an important difference in attractiveness for *Culicoides* (Fig. 5).

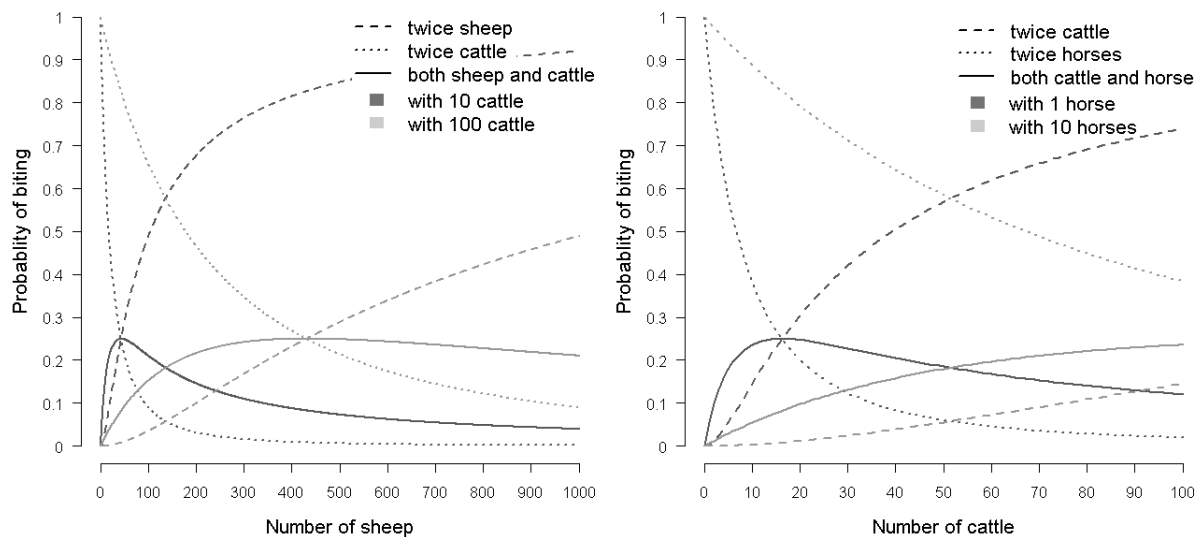


Figure 5: Probability of feeding twice on the same host species or successively on two different host species in various contexts of host abundances. Probabilities were computed as proposed by Balenghien *et al.* (2011), for horses and cattle of 600 kg, sheep of 50 kg and conditional host preferences calculated in table 2 for *C. obsoletus*

Comparison between host-baited and UV-light/suction trap collections. The number of *C. scoticus* and *C. obsoletus* collected on mare-baited trap was linearly correlated with their abundance in the UV-light/suction trap ($R^2 = 0.86$ and 0.89). The UV-light/suction trap seemed to overestimate the biting rate of *C. obsoletus* on mare and to underestimate the biting rate of *C. scoticus* on mare even if the method seems to remain the most sensitive in low abundance (Fig. 6). On the other hand, it was not possible to establish a correlation between the number of *C. dewulfi* collected by these two methods ($R^2 = 0.16$ for linear correlation).

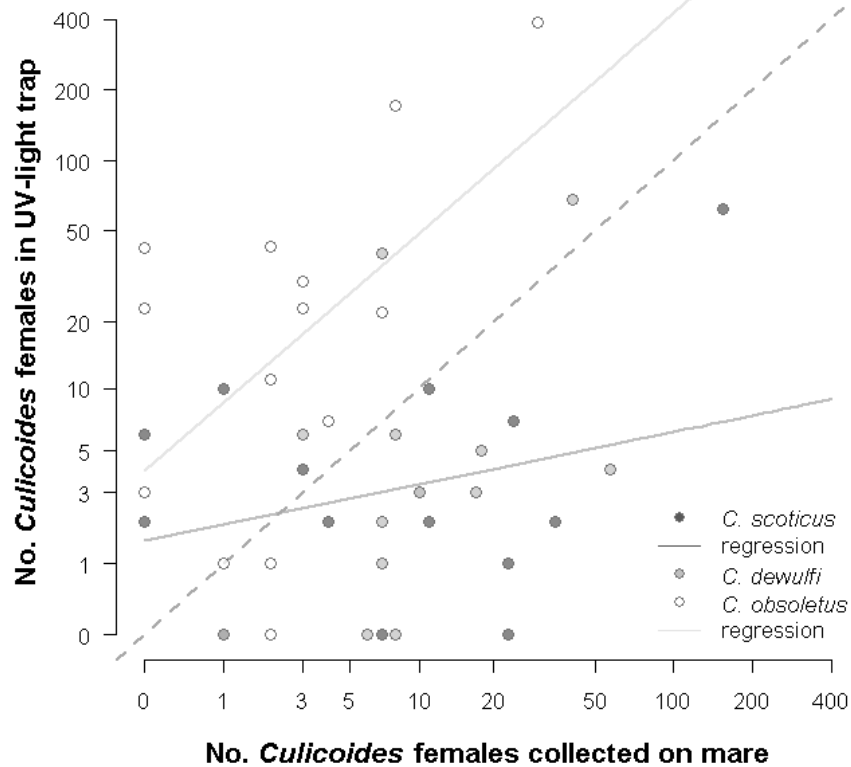


Figure 6: Correlation between the numbers of *Culicoides* females collected on mare and in the UV-light/suction trap. The dash line represents a perfect correlation between both collection methods.

Discussion

To quantify host preferences of Palearctic *Culicoides*, we carried out midge collections on birds and mammals, including horse, cattle, sheep and goat, equipped with a sticky cover. This method was shown to correctly assess the abundance of dominant species and allowed overnight collections without human manipulation (Viennet *et al.*, 2011). Presence of little engorged females (females collected on mare were engorged on sheep) and one male on the sticky covers suggested that these traps may partially act as an interception trap. However, the majority of *Culex* females tentatively identified as *Culex pipiens*, a well-known ornithophilic mosquito species (Vinogradova, 2000) collected on hen-baited trap indicated that our method was reliable to collect insects attracted by the host and that the interception effect was limited. Similarly, we collected *Stomoxys calcitrans* on mare, heifer and hens, which was concordant with the known host preferences of this species (Warnes and Finlayson, 1987; Johnson *et al.*, 2010).

Host-feeding pattern reflected the relative attractiveness of a host (determined by the responsiveness of insect to the host over distance) and the relative acceptability of that host

(determined by the insect-feeding responses after landing depending mainly on host reactions) (Boreham and Garrett-Jones, 1973; Clements, 1999; Lardeux *et al.*, 2007). With sticky cover traps, we investigated the first part of the process, *i.e.* the relative attractiveness of hosts. Main factors known to drive the attractiveness are the innate tendency of insects to respond to a class of hosts (birds, mammals) or to a given species inside a class of host, and the host size (Dow *et al.*, 1957; Edman, 1974; Lardeux *et al.*, 2007). Hematophagous insects are attracted by CO₂, respiratory moisture, body heat and odor plume emanating from hosts. Visual factors, as shape or color of hosts, may also influence attractiveness at least in the final approach phase. Factors attracting *Culicoides* are not fully understood. Color does not seem to be influent (Humphreys and Turner, 1973). CO₂ seems to attract individuals of the Variipennis Complex in North America (Nelson, 1965; Mullens, 1995), whereas CO₂ baited suction traps collected only a few *C. obsoletus* or *Culicoides parroti* Kieffer in Spain (Mullens *et al.*, 2005; Gerry *et al.*, 2009). However, it was clearly established that the host size, correlated with the amount of emanations, influences *Culicoides* attraction (Humphreys and Turner, 1973; Tanner and Turner, 1974; Raich *et al.*, 1997).

To separate effect of host size from the host preference, we used different methods to correct abundance data: weight, body surface area and Kleiber's scaling factor. Whatever the correction method, the highest numbers of *Culicoides* were collected on mare. This could be explained by: i) a clear preference for horses or ii) a non linear host size effect, with the presence of the larger animal "hiding" other hosts. It will be interesting to repeat these host-baited collections with different host animals of the same weight, and with individuals of different weights from the same host species to separate these mingled effects. *Culicoides obsoletus* was the only abundant species attracted by hens, suggesting an opportunistic host-seeking behavior, this species being known to be attracted by horse, cattle or sheep (Overgaard Nielsen, 1971; Townley *et al.*, 1984; Mullens *et al.*, 2005; Carpenter *et al.*, 2008; Gerry *et al.*, 2009). We did not highlight preferential landing sites for *C. obsoletus* on horse whereas Townley *et al.* (1984) found most of *C. obsoletus* landing and feeding on upper parts of horse, Overgaard Nielsen (1971) on belly of heifers and Viennet *et al.* (2011) on lower parts of sheep. Preferential landing sites may differ for individuals of the same *Culicoides* species depending on the host, due to variable density of wool or hairs, to the colors and temperatures according to the host body parts (Braverman, 1988). *Culicoides scoticus* and *C. dewulfi* seemed to be primary mammal feeders, attracted in our collections mainly by the horse. These species were also abundantly collected in sheep (Carpenter *et al.*, 2008). The overrepresentation of abundance in horse made difficult the comparisons of host preferences for other mammals. Host-baited trap collections should be repeated without horse to better determine host preferences for ruminants. Both species were found landing mainly on upper parts of horse, as found by Townley *et al.* (1984) for *C. dewulfi*.

After landing on host, hematophagous insects may engorge or not depending on defense reactions of host or on the "decision" of insect after skin examination. Although critical, this phase is rarely described. Tanner and Turner (1974) showed that *Culicoides arboricola* Root and Hoffman was equally attracted by rabbits and turkeys, but the engorgement rate was much higher on bird than on mammal. *Culicoides chiopterus* was collected abundantly in

drop trap baited by sheep (Carpenter *et al.*, 2008), but was found repeatedly engorged on cattle even in sheep farms (Garros *et al.*, 2011). Similarly, *C. dewulfi* females were never found engorged during collections using drop trap baited with sheep (Viennet *et al.*, 2011), whereas feeding rates were usually high in drop traps: 68% for *C. obsoletus* on sheep (Viennet *et al.*, 2011), around 45% for *C. obsoletus* and *C. dewulfi* on horse (Townley *et al.*, 1984). In the absence of further information, we considered a maximal feeding rate to compute the probability of *C. obsoletus* to feed twice on one-species host or successively on two different species in theoretical herds mixing sheep, cattle and horses. These estimated probabilities were indicators of the ability of species to transmit pathogens among populations of one host species or between populations of two different host species (Balenghien *et al.*, 2011). These calculations showed that in herds mixing cattle and sheep, pathogens such as BTV might easily be transmitted between sheep and cattle for a large range of both species abundances. Similarly, the decoy effect (decreasing of the probability to bite twice cattle) of one horse in cattle herd was rapidly compensated by the mass effect of cattle. These theoretical examples illustrated the importance to determine host preferences and the relativity of the “decoy host” method to prevent BTV transmission. However, they should be considered cautiously, because of the underlying assumption of independent successive host choices. As a matter of fact, many insect species are able to acquire knowledge of their environment, including food resources (McCall and Kelly, 2002). It has been observed for the host preference of hematophagous insects like mosquitoes (Hii *et al.*, 1991), or tsetse flies (Bouyer *et al.*, 2007). The existence of such capacity in *Culicoides* species would limit the role of bridge species and probably alter the vectorial capacity at the within-species, population level.

Finally, this work allowed the comparison of biting midge abundance in host-baited traps and in UV-light /suction trap, operated as standardized method. The comparison was somewhat limited by the experimental design and available data. A correlation could be established for *C. obsoletus* and *C. scoticus*, but not for *C. dewulfi*, showing that UV-light collections may be used to follow changes in biting rates. However, the UV-light/suction trap over-estimated *C. obsoletus* biting rates on horse and under-estimated *C. scoticus* biting rates. The same bias tendencies were recorded by Viennet *et al.* (2011) and Carpenter *et al.* (2008) for *C. obsoletus*.

Repeating this experiment in other ecological contexts will improve our understanding of *Culicoides* host-feeding patterns (host preferences, feeding rates, or relation between biting rates and UV-light/suction trap catches). Standardization of collection methods and data analysis will help quantifying parameters of the host-feeding patterns, and also better understanding and predicting the transmission risk of *Culicoides*-borne pathogens.

Acknowledgements

We are particularly grateful to the co-operators on whose premises this work was conducted. From the Plateforme d'infectiologie expérimentale (PFIE) Inra Nouzilly, we would like to thank its director B. Schwartz, and all people who gave assistance in operating traps on several nights (technicians, animal keepers, shepherds), especially P. Sarradin for his involvement in this project. This study was partly funded by CIRAD, the Ministry of Agriculture, Food, Fishing and Rural Affairs, and EU FP7-HEALTH-2010-single-stage grant 261504 EDENext. It is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENextxxx (<http://www.edenext.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and don't necessarily reflect the views of the European Commission. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors have no conflicting financial interests.

References Cited

- Balashov, Y. S. (1999) Evolution of haematophagy in insects and ticks. *Entomological Review*, **79**, 943-954.
- Balenghien, T., Fouque, F., Sabatier, P. & Bicout, D. J. (2011) Theoretical formulation for mosquito host-feeding patterns: application to a West Nile virus focus of Southern France. *Journal of Medical Entomology*, **48**, 1076-1090.
- Bennett, J. W. (1973) Regional body surface of sheep. *Journal of Agricultural Science*, **81**, 429-432.
- Berman, A. (2003) Effects of body surface area estimates on predicted energy requirements and heat stress. *Journal of Dairy Science*, **86**, 3605-3610.
- Blackwell, A., Mordue (Luntz), A. J. & Mordue, W. (1994) Identification of bloodmeals of the Scottish biting midge, *Culicoides impunctatus*, by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Medical and Veterinary Entomology*, **8**, 20-24.
- Boreham, P. F. L. & Garrett-Jones, C. (1973) Prevalence of mixed blood meals and double feeding in a malaria vector (*Anopheles sacharovi* Favre). *Bulletin of the World Health Organisation*, **6**, 1-14.
- Bouyer, J., M. Pruvot, Z. Bengaly, P.M. Guerin and R. Lancelot, 2007. Learning influences host choice in tsetse. *Biology letters -Animal behaviour*, 3: 113-116.
- Braverman, Y. (1988) Preferred landing sites of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) on a horse in Israel and its relevance to summer seasonal recurrent dermatitis (sweet itch). *Equine Veterinary Journal*, **20**, 426-429.
- Braverman, Y., Boreham, P. F. & Galum, R. (1971) The origin of blood meals of female *Culicoides pallidipennis* trapped in a sheepfold in Israel. *Journal of Medical Entomology*, **8**, 379-381.
- Carpenter, S., Szmargd, C., Barber, J., Labuschagne, K., Gubbins, S. & Mellor, P. (2008) An assessment of *Culicoides* surveillance techniques in northern Europe: have we underestimated a potential bluetongue virus vector? *Journal of Applied Ecology*, **45**, 1237-1245.
- Clements, A. N. (1999) *The biology of mosquitoes. Sensory reception and behaviour*. CABI, New York.
- Delécolle, J.-C. (1985) Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. Thèse de Doctorat d'Université mention Sciences, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
- Dow, R. P., Reeves, W. C. & Bellamy, R. E. (1957) Field tests of avian host preference of *Culex tarsalis* Coq. . *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **6**, 294-303.
- Du Toit, R. M. (1962) The role played by bovines in the transmission of bluetongue in sheep. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, **33**, 483-490.

- Dukes, H. H. (1937) Studies on the energy metabolism of the Hen *Journal of Nutrition*, 341-354.
- Dyce, A. L. (1969) The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *Journal of the Australian Entomological Society*, **8**, 11-15.
- Edman, J. D. (1974) Host-feeding patterns of Florida mosquitoes III *Culex* (*Culex*) and *Culex* (*NeoCulex*). *Journal of Medical Entomology*, **11**, 95-104.
- Edman, J. D., Webber, L. A. & Kale, H. W. I. (1972) Effect of mosquito density on the interrelationship of host behavior and mosquito feeding success *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **4**.
- Garros, C., L. Gardès, X. Allène, I. Rakotoarivony, E. Viennet, S. Rossi and T. Balenghien, (2011). Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in *Culicoides* (Ceratopogonidae: Diptera): applications on Palaearctic biting midge species, vectors of Orbiviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, **11**, 1103-1110.
- Gerry, A. C., Monteys, V. S. I., Vidal, J. O. M., Francino, O. & Mullens, B. A. (2009) Biting rates of *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) on sheep in northeastern Spain in relation to midge capture using UV light and carbon dioxide-baited traps. *Journal of Medical Entomology*, **46**, 615-624.
- Gubbins, S., Carpenter, S., Baylis, M., Wood, J. L. N. & Mellor, P. S. (2008) Assessing the risk of bluetongue to UK livestock: uncertainty and sensitivity analyses of a temperature-dependent model for the basic reproduction number. *Journal of the Royal Society Interface*, **5**, 363-371.
- Hair, J. A. & Turner, E. C. (1968) Preliminary host preference studies on Virginia *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Mosquito News*, **28**, 103-107.
- Hii, J., Chew, M., Sang, V., Munstermann, L., Tan, S., Panyim, S., *et al.* (1991) Population genetic analysis of host seeking and resting behaviors in the malaria vector, *Anopheles balabacensis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, **28**, 675-684.
- Humphreys, J. G. & Turner, J. E. C. (1973) Blood-feeding activity of female *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, **10**, 79-83.
- Johnson, G., Panella, N., Hale, K. & Komar, N. (2010) Detection of West Nile virus in stable flies (Diptera: Muscidae) parasitizing juvenile American white pelicans. *Journal of Medical Entomology*, **47**, 1205-1211.
- Lardeux, F., Loayza, P., Bouchité, B. & Chavez, T. (2007) Host choice and human blood index of *Anopheles pseudopunctipennis* in a village of the Andean valleys of Bolivia. *Malaria Journal*, **6**, 14.
- Lassen, S. B., Nielsen, S. A., Skovgard, H. & Kristensen, M. (2011) Molecular identification of bloodmeals from biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides* Latreille) in Denmark. *Parasitology Research*, **108**, 823-829.

- Lyimo, I. N. & Ferguson, H. M. (2009) Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. *Trends in Parasitology*, **25**, 189-196.
- McCall, P. J. & Kelly, D. W. (2002) Learning and memory in disease vectors. *Trends in Parasitology*, **18**, 429-433.
- Mellor, P. S., Boorman, J. & Baylis, M. (2000) *Culicoides* biting midges: Their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology*, **45**, 307-340.
- Mullens, B. A. (1995) Flight activity and response to carbon-dioxide of *Culicoides variipennis sonorensis* (Diptera, Ceratopogonidae) in Southern California. *Journal of Medical Entomology*, **32**, 310-315.
- Mullens, B. A., Owen, J. P., Heft, D. E. & Sobeck, R. V. (2005) *Culicoides* and other biting flies on the Palos Verdes Peninsula of Southern California, and their possible relationship to equine dermatitis. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **21**, 90-95.
- Murray, M. D. (1970) The identification of blood meals in biting midges (*Culicoides*: Ceratopogonidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **64**, 115-122.
- Nelson, R. L. (1965) Carbon dioxide as an attractant for *Culicoides*. *Journal of Medical Entomology*, **2**, 56-57.
- Nevill, E. M. (1978) The use of cattle to protect sheep from bluetongue infection. *Journal of the South African Veterinary Association*, **49**, 129-130.
- Nevill, E. M. & Anderson, D. (1972) Host preferences of *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) in South Africa as determined by precipitin tests and light trap catches. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **39**, 147-152.
- Ninio, C., Augot, D., Ferte, H., Breard, E., Lilin, T., Zientara, S., *et al.* (2010) A method for assessing the vectorial competence of field collected *Culicoides* Spp. for Bluetongue virus. *Parasite-Journal De La Societe Francaise De Parasitologie*, **17**, 172-172.
- Nolan, D. V., Carpenter, S., Barber, J., Mellor, P. S., Dallas, J. F., Mordue, A. J., *et al.* (2007) Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Microbiology*, **124**, 82-94.
- Overgaard Nielsen, B. (1971) Some observations on biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) attacking grazing cattle in Denmark. *Entomologica Scandinavica*, **2**, 94-98.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. <http://cran.r-project.org/manuals.html>.
- Raich, T., Jacobson, M., Holbrook, F., Babion, R., Blair, C. & Beaty, B. (1997) *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) host selection in Colorado. *Journal of Medical Entomology*, **34**, 247-249.
- Schmidt, K. A. & Ostfeld, R. S. (2001) Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology*, **82**, 609-619.

- Schmidtman, E. T., Jones, C. J. & Gollands, B. (1980) Comparative host-seeking attractivity of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) attracted to pastured livestock in Central New York State, USA. *Journal of Medical Entomology*, **17**, 221-231.
- Solano, P., Duvallet, G., Dumas, V., Cuisance, D. & Cuny, G. (1997) Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). *Acta Tropica*, **65**, 175-180.
- Stahl, W. R. (1967) Scaling of respiratory variables in mammals. *Journal of Applied Physiology*, **22**, 453-460.
- Tanner, G. D. & Turner, J. E. C. (1974) Vertical activities and host preferences of several *Culicoides* species in a southwestern Virginia Forest. *Mosquito News*, **34**, 66-70.
- Tempelis, C. H. & Nelson, R. L. (1971) Blood-feeding patterns of midges of the *Culicoides variipennis* complex in Kern county, California. *Journal of Medical Entomology*, **8**, 532-534.
- Townley, P., Baker, K. P. & Quinn, P. J. (1984) Preferential landing and engorging sites of *Culicoides* species landing on a horse in Ireland. *Equine Veterinary Journal*, **16**, 117-120.
- USEPA, U. E. P. A. (1993) *Wildlife Exposure Factors Handbook*, Washington, DC, USA.
- Velthuis, A. G. J., Saatkamp, H. W., Mourits, M. C. M., de Koeijer, A. A. & Elbers, A. R. W. (2010) Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 and 2007. *Preventive Veterinary Medicine*, **93**, 294-304.
- Viennet, E., Garros, C., Lancelot, R., Allene, X., Gardes, L., Rakotoarivony, I., *et al.* (2011) Assessment of vector/host contact: comparison of animal-baited traps and UV-light/suction trap for collecting *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of Orbiviruses. *Parasites & Vectors*, **4**, 119.
- Vinogradova, E. B. (2000) *Culex pipiens pipiens mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control*. PENSOFT Publishers, Sofia-Moscow. 250 p
- Votypka, J., Synek, P. & Svobodova, M. (2009) Endophagy of biting midges attacking cavity-nesting birds. *Medical and Veterinary Entomology*, **23**, 277-280.
- Walker, A. R. & Boreham, P. F. L. (1976) Blood feeding of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Kenya in relation of the epidemiology of bluetongue and ephemeral fever. *Bulletin of Entomological Research*, **66**, 181-188.
- Warnes, M. L. & Finlayson, L. H. (1987) Effect of host behaviour on host preference in *Stomoxys calcitrans*. *Medical of Veterinary Entomology*, **1**, 53-57.
- Wilson, A. J. & Mellor, P. S. (2009) Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, **364**, 2669-2681.



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in *Culicoides* (Ceratopogonidae: Diptera): applications on Palaearctic biting midge species, vectors of Orbiviruses

Claire Garros^{a,*}, Laëtizia Gardès^a, Xavier Allène^a, Ignace Rakotoarivony^a,
Elvina Viennet^a, Sophie Rossi^b, Thomas Balenghien^a

^a Cirad, UMR Contrôle des maladies, F-34398 Montpellier Cedex 5, France

^b Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, Unité Sanitaire de la Faune, Micropolis, la Bérardie, Belle Aureille, 05000 Gap, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 November 2010

Received in revised form 31 March 2011

Accepted 4 April 2011

Available online 12 April 2011

Keywords:

Culicoides

Blood meal analysis

Molecular identification

Trophic behaviour

Bluetongue

ABSTRACT

Culicoides are small biting midges involved worldwide in the transmission of bluetongue and African horse sickness viruses. Feeding behaviours of Palaearctic biting midge species and their spatio-temporal dynamics remain unclear at the specific level. Three multiplex species-specific PCR-based assays were developed and used to identify blood meal source of engorged females of Palaearctic midge species of veterinary interest. Species-specific primers of potential hosts from livestock, domestic animals and wildlife (cattle, goat, sheep, red deer, roe deer, chamois, dog, pig, cat, horse) were designed and multiplexed from the mitochondrial cytochrome b gene. The assays also make possible to identify whether multiple blood meals have been taken. The first results from several *Culicoides* populations sampled in France highlight the utility of this valuable diagnostic tool combined with species identification assays, and suggest that most of the *Culicoides* species may have an opportunistic feeding behaviour regarding the host distribution and density. Noteworthy is the peculiar trophic behaviour of *Culicoides chiopterus* showing clear trends to cattle. Information on host preference and feeding behaviours are crucial for a better understanding of vector–host interactions and disease epidemiology.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The degree of vector–host association is a key predictor of vectorial capacity and transmission of vector-borne pathogens. Understanding host-feeding pattern of vector species populations and their variations in space and time is important because it can contribute to a better knowledge of their respective roles in pathogen transmission, and thus in the design of accurate vector control measures or strategies. Host selection is affected by innate preferences and environmental factors such as host diversity, density and distribution in the insect environment (Lyimo and Ferguson, 2009). Although many studies of host preferences have been conducted for various mosquito or tick vector species (Mukabana et al., 2002; Humair et al., 2007; Lyimo and Ferguson, 2009), it has been a neglected area for biting midges until the spread of bluetongue in Europe.

Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) are small insects responsible for the bluetongue virus transmission to ruminants (Mellor et al., 2009). They are also involved in other *Orbivirus* transmission such as African Horse Sickness virus or Epizootic Haemorrhagic Disease virus. Before its spread through the Mediterranean basin in the late 1990s, bluetongue was considered as an exotic disease restricted to the most southern areas of Europe. The occurrence of this disease over the European territory leads to a dramatic sanitary and economical crisis and shows that some Palaearctic biting midge species are able to transmit the virus intensively; the suspected vectors belonging to the *Obsoletus* and *Pulicaris* Groups (Caracappa et al., 2003; Savini et al., 2005; Carpenter et al., 2006; Meiswinkel et al., 2007; Dijkstra et al., 2008).

Most *Culicoides* species are suspected to be mammophilic, biting mostly domestic and wild mammals (Blackwell et al., 1994; Linden et al., 2010). Recent studies in the Palaearctic region showed that *Culicoides obsoletus* was attracted and found blood-fed on sheep or goat (Carpenter et al., 2008; Gerry et al., 2009; Mullens et al., 2010). *Culicoides parroti* has been found feeding on horses and sheep (Mellor and McCaig, 1974; Gerry et al., 2009). *Culicoides impunctatus* is mostly known for its anthrophilic behaviour, while *Culicoides circumscriptus* is considered to be a bird feeder

* Corresponding author at: UMR 15 Cirad-INRA, Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes, Campus International de Baillarguet, TA-A15/A, 34398 Montpellier Cedex 5, France. Tel.: +33 04 67 59 37 01.

E-mail address: claire.garros@cirad.fr (C. Garros).

(Blackwell et al., 1994). Some species feed on reptiles and frogs (Votykpa et al., 2009).

Despite these studies, many questions remain unanswered regarding feeding patterns of most of biting midge species of veterinary interest. Do species have opportunistic or specialist feeding behaviours? Are there any spatio-temporal variations in feeding patterns? Are there species biting wild ruminants?

Development of PCR-based assays to identify blood meals from sympatric wild and domestic mammals will help answer these questions. Earlier investigations had used immunological assays (Murray, 1970; Braverman et al., 1971, 1977; Tempelis and Nelson, 1971; Braverman and Phelps, 1981; Blackwell et al., 1994) but these tools have several inherent problems (see review in Mukabana et al., 2002). The development of PCR-based technologies provides a more direct approach to identify host species and increases sensitivity and specificity (Mukabana et al., 2002). PCR-based assays using different genetic markers have been developed for mosquitoes targeting potential hosts for malaria or West Nile research purposes (pig, human, goat, dog, and cow; and avian orders respectively) (Ngo and Kramer, 2003; Kent and Norris, 2005). Mitochondrial DNA such as cytochrome b or cytochrome oxidase I (COI) are mostly selected because they exhibit a high level of interspecific polymorphism which helps to design species-specific primers (Hebert et al., 2003). A recent paper proposed a PCR-based method to identify blood meal origins of *Culicoides* but the number of host species available was limited (Bartsch et al., 2009). Moreover, species identification at the specific level was not done; it is difficult thus to draw conclusions on species feeding behaviours. Lassen et al. (2010) and Ninio et al. (2010) studied blood meal origins in Denmark and France respectively, using sequencing followed by comparison of sequence homology through GenBank. Although this method is accurate, it requires time (two main steps: PCR amplification and sequencing) and is limited by the sequences present in GenBank.

The purpose of this study was to develop PCR-based assays to identify blood meal origin from potential livestock, domestic animals and wild ruminants in *Culicoides* females and to use this molecular tool on field-collected engorged females sampled in various localities over France using Onderstepoort black-light traps localized in farms closed to livestock. Garcia-Saenz et al. (2010) demonstrated that female catches in light traps increased linearly with baited animal numbers (sheep in the study), at least for limited host numbers. These results make consistent the assumption that baited light traps collect host-seeking females attracted by the presence of animals and therefore one can hypothesize that engorged females collected by such traps are expected to have feed on the nearest animal, the animal baits.

2. Materials and methods

2.1. DNA extraction, primer design and validation with blood samples

Host primers were selected from Tobe and Linacre (2008) for identifying cattle, sheep, goat, red deer, dog, cat, pig and horse and designed by the authors for chamois and roe deer based on cytochrome b (cytb) polymorphism (Table 2). Primers were designed manually and confirmed using Webprimer (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>). The location for primer sequences was chosen on the criteria of at least three nucleotide differences between host species and PCR product sizes easily distinguishable by agarose gel electrophoresis (minimum of 20 nucleotides of differences).

EDTA-blotted blood collected in vet clinics from domestic hosts (cattle, goat, sheep, dog, cat, horse) and EDTA-blotted blood or spleen from wild ruminants collected by ONCFS were DNA-extracted using a commercial kit (DNeasy Tissue & Blood, Qiagen, Valencia, CA, USA) and used as positive controls. Abdomens of engorged biting midge females were separated from the body. DNA

Table 1
Characteristics of the six farms where *Culicoides* were collecting from week 12 to 22 in 2009.

Farm code	GPS location and administrative unit	Host diversity and host abundance	Presence of wild ruminants	Trap localization
Farm A	00°38'30", 45°58'47" Charente Maritime	140 sheep plus lambs	Wild boars, roe deer	Inside animal shelter, widely open
Farm B	01°44'39", 43°20'00" Pyrénées Atlantiques	180 sheep plus lambs	Wild boars, red deer, roe deer	Inside animal shelter, widely open
Farm C	00°46'56", 43°38'45" Gers	50 cattle	Wild boars, roe deer	Inside animal shelter, closed building
Farm D	01°39'50", 48°26'58" Ile et Vilaine	140 cattle, 6 sheep plus lambs	Wild boars, roe deer	Outside, closed to cattle
Farm E	02°53'13", 47°05'11" Cher	200 goats, 75 cattle	Wild boars, red deer, roe deer	Inside animal shelter with little openings

Table 2
Primer set used for the identification of blood meal origin in *Culicoides* abdomens.

Reverse primers	Forward primer	Primer sequence (5' → 3')	Length (bp)
Dog <i>Canis lupus familiaris</i>	CANIS	GACCAATGATATGAAAAACCATCGTTGT	170
Pig <i>Sus scrofa</i>	SUS	CAAGCATACCTCTAGTAAGGATCCG	219
	Forward primer UNIV2	TCTGATGTGTAATGTATTGCTAAGAAC	
Chamois <i>Rupicapra rupicapra</i>	RUPI	TGAGGACAAATATCATTYTGAGGRGC	90
Red deer <i>Cervus elaphus</i>	CERVUS	TGAGGGTAGCCTTGCTACCGAGAAGCCT	188
Roe deer <i>Capreolus capreolus</i>	CAPREOLUS	AGTAAGTGACTATAGCGAGTGCTGCG	220
Cow <i>Bos taurus</i>	BOS	TTGTCCGCGTTTGATGGATTCTATC	287
Goat <i>Caprus hircus</i>	CAPRA	TAAGATGCTCTAATGGTATAGTAG	313
Sheep <i>Ovis aries</i>	OVIS	TTAGAACAAGAATTAGTAGCATGGCG	336
	Forward primer UNIV3	GGCGTGAATAGTACTAGTATGAGGATGA	
Cat <i>Felis catus</i>	FELIS	TTTTTTTTTTTCGVTCHATYCCAAAYAACTAGG	180
Horse <i>Equus caballus</i>	EQUUS	GATTTCATGTTAGGGTTAGGAGATCC	208
		TACGTATGGGTGTTCCACTGGC	

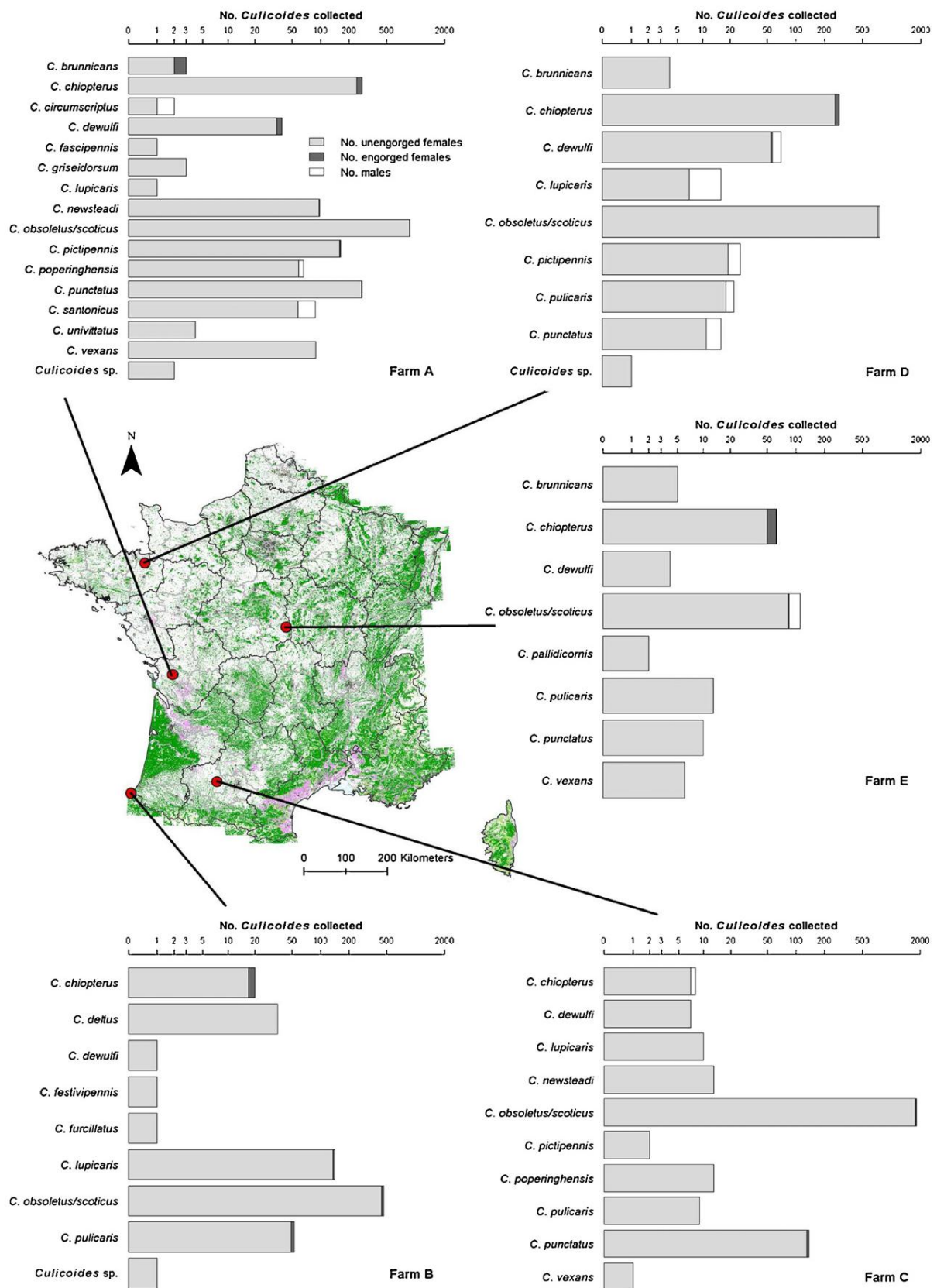


Fig. 1. Localization of study sites and diversity of biting midge species collected at these study sites.

extraction was processed using commercial kit (NucleoSpin Tissue, Magerey-Nagel, Düren, Germany) starting with each individual abdomen ground in 200 µL of PBS buffer.

To check specificity, each primer set was first used in simplex assay with corresponding host DNA according to the following procedure. In a final volume of 25 µL, PCR conditions were as follows: 2.5 µL 10× reaction buffer, 200 µM of each dNTP, 10 µM of each primer, and 1.25U Taq polymerase (Qiagen), and 25–50 ng of host DNA template. PCR cycles were as follows: one cycle of 94 °C for 2 min, followed by 40 cycles at 94 °C for 30 s, 53 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, and 72 °C for 10 min. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel stained with GelRed (Biotium). To evaluate cross-reactivity, each primer set was also tested with all other host DNA following the same protocol.

2.2. Species-specific multiplex PCR assay

Because multiplexing numerous primer sets can lead to cross-reactivity, we decided to define multiplex combinations. Therefore, primers for domestic and wild ruminants were used in a PCR-based assay with UNIV2 as forward universal, and primers for domestic hosts were used in two separate assays (Table 2). Positive controls were used to set up the three multiplex PCR-based assays. PCR conditions were as described above and PCR cycles were as follows for UNIV1 or UNIV3 primer set: one cycle of 94 °C for 5 min, followed by 40 cycles at 94 °C for 30 s, 53 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, and 72 °C for 10 min. To reduce nonspecific amplifications,

touchdown PCR cycles were used for UNIV2 primer set: one cycle of 94 °C for 5 min, followed by 20 cycles at 94 °C for 30 s, 61 °C for 30 s, 72 °C for 30 s with a decrease of the annealing temperature of 0.5 °C for each cycle, followed by 15 cycles at 94 °C for 30 s, 53 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, and final elongation step for 10 min at 72 °C. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel stained with GelRed, including positive controls for each set of abdomen tested.

2.3. Study area and biting midge collections

Biting midges were collected by using light traps on six farms (A–E) in France operating from week 12 (February) to week 22 (June) in 2009 (Fig. 1). Sites were selected for their host diversity and to represent different ecological environments. Table 1 describes characteristics for the different sites. Biting midges were collected using Onderstepoort black-light suction traps operated one night every week. Depending on the study sites, traps were always situated close to animals, either outside animal shelters or inside (Table 1).

Culicoides were morphologically identified under stereomicroscope using an identification key for Palaearctic *Culicoides* species (Delécolle, 1985). For closely related species, specimens were dissected and mounted for morphological identification under microscope. All females with an engorged abdomen were individually isolated and labelled for further processing. When engorged females of the *Obsoletus* Group (*Culicoides dewulfi*, *C.*

Table 3

Blood meal identifications of engorged *Culicoides*. In bold, host(s) present in the farm. When two hosts present, the asterisk shows to whom host the trap is closer.

Farm A	Number of engorged females tested			44
	Cattle	Goat	Sheep	Negatif
<i>C. brunnicans</i>	0	0	1	0
<i>C. chiopterus</i>	26	0	1	5
<i>C. dewulfi</i>	0	0	5	0
<i>C. newsteadi</i>	0	0	1	0
<i>C. obsoletus</i>	0	0	3	0
<i>C. pictipennis</i>	0	0	2	0
	26 (59.1%)	0	13 (29.5%)	5 (11.4%)
Farm B	Number of engorged females tested			18
	Cattle	Goat	Sheep	Negatif
<i>C. chiopterus</i>	3	0	0	0
<i>C. lupicaris</i>	0	0	1	0
<i>C. obsoletus</i>	0	0	1	0
<i>C. pulicaris</i>	0	0	1	3
<i>C. scoticus</i>	0	0	8	1
	3 (16.7%)	0	11 (61.1%)	4 (22.2%)
Farm C	Number of engorged females tested			35
	Cattle	Goat	Sheep	Negatif
<i>C. obsoletus</i>	26	0	0	1
<i>C. punctatus</i>	6	0	0	0
<i>C. scoticus</i>	2	0	0	0
	34 (97.1%)	0	0	1 (2.9%)
Farm D	Number of engorged females tested			30
	Cattle*	Goat	Sheep	Negatif
<i>C. chiopterus</i>	26	0	0	0
<i>C. dewulfi</i>	2	0	0	0
<i>C. obsoletus</i>	0	0	2	0
	28 (93.3%)	0	2 (6.7%)	0
Farm E	Number of engorged females tested			14
	Cattle	Goat*	Sheep	Negatif
<i>C. chiopterus</i>	6	6	0	0
<i>C. scoticus</i>	0	2	0	0
	6 (42.9%)	8 (57.1%)	0	0

chiopterus, *C. obsoletus* and *Culicoides scoticus*) were identified, molecular species identifications were done to confirm morphological identification for *C. dewulfi*, *C. chiopterus* and to differentiate *C. obsoletus* and *C. scoticus*. Molecular identifications were done following instructions by Nolan et al. (2007).

2.4. Multiple host feeding analysis

Additional experiments were conducted to evaluate the sensitivity of the diagnostic assay on mixed hosts as biting midges may take multiple blood meals from different hosts in the field. DNA blood samples and DNA templates from engorged abdomens were mixed at ratios of 50:50 prior to PCR amplification as described above.

3. Results

A total of 6115 *Culicoides* individuals were collected from week 12 to 22 in the five study sites in which 5915 were females (Fig. 1). Diversity of *Culicoides* varied depending on sites, reflecting the environmental differences in France (Fig. 1). The dominant species belonged to the *Obsoletus* complex (including *C. obsoletus* and *C. scoticus*) in all sites; these sibling species represented between 44 and 90%. *C. chiopterus* represented the second most commonly collected species at northern sites (14, 24 and 29% in farms A and D), and became rare at southern sites (0.4 and 3% in farms C and B) showing a clear north-southern distribution gradient. From these

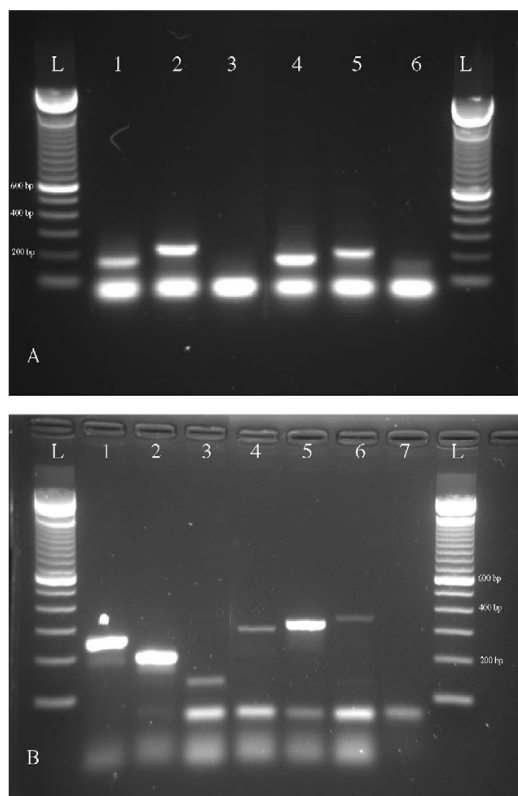


Fig. 2. Species-specific PCR amplifications. (A) L: 100 bp molecular DNA ladder, 1: blood DNA template from dog, 2: blood DNA template from pig, 3: negative control, 4: blood DNA template from cat, 5: blood DNA template from horse, 6: negative control. (B) L: 100 bp molecular DNA ladder, 1: blood DNA template from roe deer, 2: blood DNA template from red deer, 3: blood DNA template from chamois, 4: blood DNA template from cattle, 5: blood DNA template from goat, 6: blood DNA template from sheep, 7: negative control.

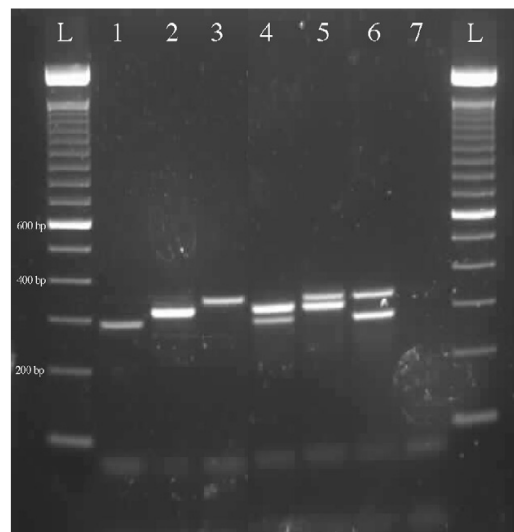


Fig. 3. Species-specific PCR amplifications simulating multiple feedings. L: 100 bp molecular DNA ladder, 1: blood DNA template from cattle, 2: blood DNA template from goat, 3: blood DNA template from sheep, 4: blood DNA template from cattle and goat, 5: blood DNA template from goat and sheep, 6: blood DNA template from cattle and sheep, 7: negative control.

collections, a total of 141 engorged females were tested for blood meal origin (Table 3). All engorged females belonging to the *Obsoletus* group were morphologically and molecularly identified. Two of the 37 *C. obsoletus/scoticus* individuals were morphologically misidentified as *C. dewulfi* and *C. chiopterus* respectively.

Species-specific *cytb* amplicons of the predicted size were amplified from dog, pig, cattle, goat, sheep, red deer, roe deer, chamois, horse and cat using blood samples from known animals (Fig. 2). Fig. 3 shows that the assays can be used to identify blood meals taken on multiple hosts.

The molecular identification of blood meal origins from engorged midges is given in Table 3. No individuals were positive for dog, cat, pig, horse, red deer, roe deer, or chamois. Sequencing of two amplicons for each host species, and sequence comparisons of amplicons confirmed the blood source (not shown). Host DNA was not amplified in 11 individuals (<8%) and amplification/sequencing of other markers (COI) failed too. When comparing host diversity and blood meal origins in each site, one can observe that the blood meals were taken on the present hosts, except for *C. chiopterus* individuals which were found positive for cattle in ovine farms (Farms A and B). In Farm E where goats and bovine were present, the trap being localized close to both hosts, *C. chiopterus* was found positive for both hosts. In Farm D where cattle and sheep were present, the trap being close to cattle, *C. chiopterus* was found blood-fed on cattle whereas *C. obsoletus* was positive for sheep. No multiple blood meals in field collected females were identified.

4. Discussion

Many epidemiologically important issues revolve around the questions of host preferences and feeding behaviours of vector arthropods. This work presents a quick, easy-to-use and appropriate tool to molecularly identify blood meal origin from *Culicoides* biting midges collected in areas hosting wild and domestic ruminants.

The introduction of PCR-based technology using host mitochondrial DNA has eliminated the obstacles of immunological assays (Mukabana et al., 2002) and provides a more direct

approach to identification of host species because sera do not have to be collected and specific antibodies produced. Blood meal origin was identified using three allele-specific multiplex PCR-based assays based on cytb polymorphism. Each primer set amplifies specifically and at a species-specific size for livestock (cattle, sheep and goat), other domestic animals (cat, dog, horse, pig) and wild ruminants (roe deer, red deer, chamois). Multiplex PCR-based assay is a rapid, cost-effective and efficient method applicable on a routine basis in a laboratory when a high number of samples are tested. Several assays have already been developed to molecularly identify blood meal origin for various hematophagous arthropods such as mosquitoes, *Glossina* flies, or sand flies (Mukabana et al., 2002; Ngo and Kramer, 2003; Kent, 2009). However, it requires *a priori* choice for the primer sets and therefore the targeted hosts. This *a priori* selection of the potential hosts can lead to a high number of unidentified blood meals, requiring then full amplification of the whole region and sequencing. This tool is probably inappropriate in any environment system where scarce wild or domestic ruminants are present. No differentiation has been made between domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*), sheep and mouflon (*Ovis gmelini musimon*), and ibex (*Capra ibex*) and goat because of their close phylogenetic proximity and absence of polymorphism on cytb. The mean percentage of unamplified DNA host is 7.8% for all farms. Bartsch et al. (2009) obtained a percentage varying from 12% to 44% depending on the location, Lassen et al. (2010) and Ninio et al. (2010) have respectively 10% and 9% of non-amplified DNA host. For field specimens where blood meal identification failed, different hypotheses can be put forward: (i) the blood meal volume is too low, (ii) the process of digestion may have denaturated host DNA or (iii) the individual may have fed on a host not included in the diagnostic assay. For this last hypothesis, sequencing of the COI region with universal vertebrate primers could help identify the host (Bartsch et al., 2009). Because detection of small amounts of host DNA is challenging, abdomens were dissected from head and thorax for each individual to maximize host DNA concentrations. Several studies have also highlighted that there is a significant negative relationship between the time since ingestion and the success of analysis (Mukabana et al., 2002; Oshaghi et al., 2006). Moreover, the assay is designed on the mitochondrial DNA (cytb gene) which occurs in high copy numbers in the genome, and the amplicon sizes are small (less than 300 bp). Therefore, the chance to amplify the species-specific region with degraded biological material is maximized. No mixed blood meals were detected in the present study as previously found for *C. impunctatus* in Scotland (Blackwell et al., 1994) and other studies (Lassen et al., 2010; Ninio et al., 2010). Although it is essential to establish whether mixed feeding may occur, the small amount of blood needed to complete a blood meal for a biting midge (0.1–1 µg of blood) (Leprince et al., 1989) is so small that even an interrupted blood meal may be enough to complete oogenesis.

Depending on purposes, traps used are selected to be as most as possible representative of the proportion of the population to be studied. Collecting biting midges is challenging, especially engorged females. Collecting engorged females directly in resting places would be the most unbiased sampling method and would increase the number and the diversity of *Culicoides* to be tested, but to date, the resting places of *Culicoides* remain poorly described. Unbaited traps such as vehicle-mounted traps have been used but they are not easy to use in the field and the number of engorged females collected is very limited (Nelson and Bellamy, 1971; Roberts and Kumar, 1994). Baited light-traps are widely used for surveillance and research activities but the proportion of the population collected is not very well understood. When used with animal baits, light traps collected the active flying part of the population (males and females), with most of females being host-

seeking females; a recent study has demonstrated that number of females collected was correlated to baited animals, at least with less than 6 baited animals (Garcia-Saenz et al., 2010). Even though baited light traps are not effective at trapping high numbers of engorged females (Bartsch et al., 2009; Venter et al., 2009; Lassen et al., 2010; Ninio et al., 2010), the number collected can be hypothesized to have fed on the closest animal. Our sampling strategy was to use light traps close to livestock therefore we expect that engorged females had blood-fed on the hosts present at study sites.

The difficulty to collect engorged *Culicoides* with regular trapping systems is a limiting factor to have a broad picture of the feeding behaviour of species. Bartsch et al. (2009) have collected 177 fully engorged females for 5854 females collected in total, Lassen et al. (2010) 251 engorged females for 8378 biting midges. Votypka et al. (2009) used host-baited traps to collect *Culicoides* and also found low number of blood engorged females (70 for 667 captured biting midges). It is desirable that future studies included different locations or over a long time period to increase the number of engorged females tested, and to test additional capture methodologies (e.g. host attractant baited traps, suction traps). Moreover, in-depth studies in different locations including resting habitats at different daytime (Balenghien et al., 2008) and over a long time period may increase the number of engorged females collected.

No engorged females fed on wild host were collected. Our sampling strategy was to use light traps near to domestic animals, knowing that wild hosts occurred around. A previous study demonstrated that engorged females could be active after their blood meal. Lassen et al. (2010) collected in a forest area distant of 800 m from the nearest cattle, females that fed on cattle. Our negative results obtained in regards to wild fauna might be explained in terms of low probability of captures because of our sampling strategy, but one cannot rule out the possibility that females do not feed on wild animals.

The results showed that the engorged females collected had fed on the nearest animal (hosts present in the study farms) except for the engorged females of *C. chiopterus*. It is perhaps more appropriate to characterize the behaviour of populations rather than whole taxonomic units, especially in the case of species that occur in a wide range of environmental conditions over large spatial extents and with unknown population genetic structure (Lefevre et al., 2009). Surprisingly engorged females of *C. chiopterus* from two study sites were found positive for cattle whereas only sheep were present in the farms. Further investigations around the farms showed that few cattle were present in a surrounding 2 km buffer zone in pasture areas. Lassen et al. (2010) collected engorged females on cattle with a black light trap localized in a forest, 800 m from the nearest farm. Bartsch et al. (2009) estimated this distance of about 200 m but our results may lean towards a higher distance. Although, passive dispersion by wind may occur, active dispersion capacity of biting midge species is not well described and, these results allow hypothesizing long active flight for engorged females.

Carpenter et al. (2008) collected *C. chiopterus* on sheep but no indication were given whether they were engorged females on sheep. This difference may be explained by population heterogeneities or that *C. chiopterus* are attracted by sheep but do not feed on the host. Our results in farm D (presence of both sheep and cattle, the trap being close to the latter species) showed engorged female *C. chiopterus* positive for cattle only whereas *C. chiopterus* in farm E (presence of cattle and goat) was positive for both hosts. Together with previous works, our results highlight peculiar aspects of the behavioural ecology of *C. chiopterus* and the necessity to study the *Culicoides* ecology at the species and not at the group level. The species is known to attack cattle and horses and to breed exclusively in their dung (Dijkstra et al., 2008). These

first results show opportunistic trends expect for *C. chiopterus* which seems to be more associated with cattle for larval ecology (Dijkstra et al., 2008) and feeding behaviour as also confirmed by Ninio et al. (2010) and Lassen et al. (2010). This is of epidemiological importance since this species has been found PCR-positive for bluetongue virus in the Netherlands and France in 2007 (Dijkstra et al., 2008) (Balenghien, personal communication).

Temporal and spatial variation in host availability might play an important role in selecting feeding tendencies (Lyimo and Ferguson, 2009). This is well known for mosquitoes where variability in host availability could select for a non-specific host feeding behaviour. Most of the information on relationship between availability and host species comes from studies of mosquitoes (see review in Lyimo and Ferguson (2009)). Long-term reduced accessibility to humans by *Anopheles gambiae*, mainly an anthropophilic mosquito, has been proposed to explain an observed zoophilic behavioural pattern of *A. gambiae* in Burkina Faso (Lefevre et al., 2009). This selection of a non-specialist rather than specialist strategy might be observed under marked spatial variation in host accessibility.

Future studies should also focus on wild ruminants since that they may maintain bluetongue virus. Recently, BTV specific antibodies have been detected in at least five asymptomatic species of wild ruminants in Spain (Ruiz-Fons et al., 2008; Rodriguez-Sanchez et al., 2010b). Among these species, the red deer (*Cervus elaphus*) maintained detectable BTV-4 RNA for one year after the virus was cleared from livestock (Rodriguez-Sanchez et al., 2010a).

In conclusion, the multiplex PCR assay reported in this study provides a rapid and efficient tool for the identification of blood meal origins of biting midges. More studies are needed to investigate at the species level trophic behaviours in other locations.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Direction des Services Vétérinaires (DSV) for their help in collecting the biting midges, Jean-Claude Delécolle (University of Strasbourg, France) for sharing its knowledge on taxonomy of *Culicoides*, Anne Thieffine (veterinarian) for providing blood samples of domesticated animals. Thanks also goes to Carole Toigo, Thierry Hantzberg and Gaël Reynaud, Jean-Luc Hamann, Jean-Michel Jullien and Philippe Gibert from the French game and wildlife agency (ONCFS) who collected the tissues in wild animals, and to the veterinary laboratories (Savoie and Bas-Rhin) that stored them. Finally we also thank the network for wild ungulates that provide us data on wild species availability around farms. The authors would like to thank Thierry Baldet (IRD, Benin) for commenting the manuscript.

This work has been partially funded by the Ministry of Agriculture, Food, and Rural Affairs.

References

- Balenghien, T., Cetre-Sossah, C., Grillet, C., Delécolle, J.C., Mathieu, B., Baldet, T., 2008. Diurnal activity of potential bluetongue vectors in northern Europe. *Vet. Rec.* 162, 323–324.
- Bartsch, S., Bauer, B., Wiemann, A., Clausen, P.H., Steuber, S., 2009. Feeding patterns of biting midges of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* groups on selected farms in Brandenburg, Germany. *Parasitol. Res.* 105, 373–380.
- Blackwell, A., Mordue, A.J., Mordue, W., 1994. Identification of bloodmeals of the Scottish biting midge, *Culicoides impunctatus*, by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Med. Vet. Entomol.* 8, 20–24.
- Braverman, Y., Boreham, P.F.L., Galum, R., 1971. The origin of blood meals of female *Culicoides pallidipennis* trapped in a sheepfold in Israel. *J. Med. Entomol.* 8, 379–381.
- Braverman, Y., Boreham, P.F.L., Galum, R., Ziv, M., 1977. The origin of blood meals of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and mosquitoes (Diptera: Culicidae) trapped in turkey runs in Israel. *Rhod. J. Agric. Res.* 15, 101–104.
- Braverman, Y., Phelps, R.J., 1981. Species composition and blood-meal identification in samples of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) collected near Salisbury Zimbabwe in 1976–77. *J. Entomol. Soc. S. Afr.* 44, 315–323.
- Caracappa, S., Torina, A., Guercio, A., Vitale, F., Calabrò, A., Purpari, G., Ferrantelli, V., Vitale, M., Mellor, P.S., 2003. Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. *Vet. Rec.* 153, 71–74.
- Carpenter, S., Lunt, H.L., Arav, D., Venter, G.J., Mellor, P.S., 2006. Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) from the United Kingdom. *J. Med. Entomol.* 43, 73–78.
- Carpenter, S., Szmaragd, C., Barber, J., Labuschagne, K., Gubbins, S., Mellor, P., 2008. An assessment of *Culicoides* surveillance techniques in northern Europe: have we underestimated a potential bluetongue virus vector? *Journal of Applied Ecology* 45, 1237–1245.
- Delécolle, J.C., 1985. Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) du Nord-est de la France. Thesis Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
- Dijkstra, E., van der Ven, I.J., Meiswinkel, R., Holzel, D.R., Van Rijn, P.A., 2008. *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. *Vet. Rec.* 162, 422.
- García-Saenz, A., McCarter, P., Baylis, M., 2010. The influence of host number on the attraction of biting midges *Culicoides* spp., to light traps. *Med. Vet. Entomol.* 25, 113–115.
- Gerry, A.C., Sarto i Montey, V., Moreno Vidal, J.O., Francino, O., Mullens, B.A., 2009. Biting rates of *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) on sheep in north-eastern Spain in relation to midge capture using UV light and carbon dioxide-baited traps. *J. Med. Entomol.* 46, 615–624.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 270, 313–321.
- Humair, P.F., Douet, V., Moran Cadenas, F., Schouls, L.M., Van De Pol, I., Gern, L., 2007. Molecular identification of bloodmeal source in *Ixodes ricinus* ticks using 12S rDNA as a genetic marker. *J. Med. Entomol.* 44, 869–880.
- Kent, R.J., 2009. Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Mol. Ecol. Res.* 9, 4–18.
- Kent, R.J., Norris, D.E., 2005. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 336–342.
- Lassen, S.B., Nielsen, S.A., Skovgaard, H., Kristensen, M., 2010. Molecular identification of bloodmeals from biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides* Latreille) in Denmark. *Parasitol. Res.*
- Lefevre, T., Gouagna, L.C., Dabire, K.R., Elguero, E., Fontenille, D., Renaud, F., Costantini, C., Thomas, F., 2009. Beyond nature and nurture: phenotypic plasticity in blood-feeding behavior of *Anopheles gambiae* s.s. when humans are not readily accessible. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 1023–1029.
- Leprince, D.J., Higgins, J.A., Church, G.E., Issel, C.J., McManus, J.M., Foil, L.D., 1989. Body size of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) in relation to bloodmeal size estimates and the ingestion of *Onchocerca cervicalis* (Nematoda: Filarioidea) microfilariae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 5, 100–103.
- Linden, A., Gregoire, F., Nahayo, A., Hanrez, D., Mousset, B., Massart, A.L., De Leeuw, I., Vandemeulebroucke, E., Vandenbussche, F., De Clercq, K., 2010. Bluetongue virus in wild deer Belgium, 2005–2008. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 833–836.
- Lyimo, I.N., Ferguson, H.M., 2009. Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. *Trends Parasitol.* 25, 189–196.
- Meiswinkel, R., van Rijn, P., Leij, P., Goffredo, M., 2007. Potential new *Culicoides* vector of bluetongue virus in northern Europe. *Vet. Rec.* 161, 564–565.
- Mellor, P.S., Baylis, M., Mertens, P.P.C., 2009. Bluetongue. Academic Press, Elsevier, p. 483.
- Mellor, P.S., McCaig, J., 1974. The probable cause of "sweet itch" in England. *Vet. Rec.* 95, 411–415.
- Mukabana, W.R., Takken, W., Knols, B.G., 2002. Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. *Trends Parasitol.* 18, 505–509.
- Mullens, B.A., Gerry, A.C., Montey, V.S., Pinna, M., Gonzalez, A., 2010. Field studies on *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) activity and response to deltamethrin applications to sheep in northeastern Spain. *J. Med. Entomol.* 47, 106–110.
- Murray, M.D., 1970. The identification of blood meals in biting midges (*Culicoides*: Ceratopogonidae). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 64, 115–122.
- Nelson, R.L., Bellamy, R.E., 1971. Patterns of flight activity of *Culicoides variipennis* (Coquillett) (Diptera: Ceratopogonidae). *J. Med. Entomol.* 8, 283–291.
- Ngo, K.A., Kramer, L.D., 2003. Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. *J. Med. Entomol.* 40, 215–222.
- Ninio, C., Augot, D., Delecolle, J.C., Dufour, B., Depaquit, J., 2010. Contribution to the knowledge of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) host preferences in France. *Parasitol. Res.* 108, 657–663.
- Nolan, D.V., Carpenter, S., Barber, J., Mellor, P.S., Dallas, J.F., Mordue Luntz, A.J., Piertney, S.B., 2007. Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Vet. Microbiol.* 124, 82–94.
- Oshaghi, M.A., Chavshin, A.R., Vatandoost, H., Yaaghoobi, F., Mohtarami, F., Noorjah, N., 2006. Effects of post-ingestion and physical conditions on PCR amplification of host blood meal DNA in mosquitoes. *Exp. Parasitol.* 112, 232–236.
- Roberts, D., Kumar, S., 1994. Using vehicle-mounted nets for studying activity of Arabian sand flies (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 31, 388–393.
- Rodriguez-Sanchez, B., Gortazar, C., Ruiz-Fons, F., Sanchez-Vizcaino, J.M., 2010a. Bluetongue virus serotypes 1 and 4 in red deer. Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 518–520.

- Rodriguez-Sanchez, B., Sánchez-Cordón, P.J., Molina, V., Rialde, M.A., de Diego, A.C., Gómez-Villamandos, J.C., Sánchez-Vizcaino, J.M., 2010b. Detection of bluetongue serotype 4 in mouflons (*Ovis aries musimon*) from Spain. *Vet. Microbiol.* 141, 164–167.
- Ruiz-Fons, F., Reyes-García, A.R., Alcaide, V., Gortázar, C., 2008. Spatial and temporal evolution of bluetongue virus in wild ruminants. Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 951–953.
- Savini, G., Goffredo, M., Monaco, F., Di Gennaro, A., Cafiero, M.A., Baldi, L., de Santis, P., Meiswinkel, R., Caporale, V., 2005. Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides* Diptera: Ceratopogonidae) in Italy. *Vet. Rec.* 157, 133–139.
- Tempelis, C.H., Nelson, R.L., 1971. Blood-feeding patterns of midges of the *Culicoides variipennis* complex in Kern County, California. *J. Med. Entomol.* 8, 532–534.
- Tobe, S.S., Linacre, A.M., 2008. A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene. *Electrophoresis* 29, 340–347.
- Venter, G.J., Labuschagne, K., Hermanides, K.G., Boikanyo, S.N., Majatladi, D.M., Morey, L., 2009. Comparison of the efficiency of five suction light traps under field conditions in South Africa for the collection of *Culicoides* species. *Vet. Parasitol.* 166, 299–307.
- Votypka, J., Synek, P., Svobodova, M., 2009. Endophagy of biting midges attacking cavity-nesting birds. *Med. Vet. Entomol.* 23, 277–280.

Discussion du chapitre 3

Dans l'étude par approche directe, nous avons choisi de quantifier la préférence trophique des espèces paléarctiques de *Culicoides* en réalisant des piégeages avec couvertures collantes sur oiseaux (poules) et mammifères (poney, chèvre, mouton et génisse). Le système des couvertures collantes, testé lors du travail précédent de comparaison de piège, a été choisi car il permet de longues captures sans intervention humaine. La présence de deux femelles gorgées sur mouton et capturées sur le poney et d'un mâle sur la cage des poules illustre que le piège collant peut avoir agit, dans une certaine mesure, comme un piège à interception. Cependant, cet effet doit rester limité, dans la mesure où *Culex pipiens*, connu comme principalement ornithophile (Vinogradova, 2000), a été capturé essentiellement sur le piège des poules. De même, les *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus) connus pour être capables de se gorger sur bovins, chevaux et oiseaux (Warnes and Finlayson, 1987; Johnson *et al.*, 2010) ont effectivement été capturés sur poney, génisse et poules. Les hôtes étaient séparés les uns des autres d'environ 50 m. Ainsi, on peut supposer qu'ils étaient suffisamment éloignés pour qu'un *Culicoides* retrouvé sur un hôte donné n'ait pas été attiré par l'hôte le plus proche, mais aussi suffisamment proches pour que les *Culicoides* puissent percevoir les hôtes de manière équivalente et « choisir » un hôte donné conditionnellement à la présence des autres. Il est connu que les individus d'une même espèce n'attirent pas les insectes de la même manière, à cause de différences liées au sexe, à l'âge, au stade physiologique, à la couleur, à l'odeur, à la température corporelle, aux mouvements de défense, etc. Nous avons fait l'hypothèse que les différences d'attractivité interspécifiques étaient plus importantes que les différences intraspécifiques.

On peut décomposer la recherche d'hôte en plusieurs étapes. La première constitue le « comportement appétitif », c'est-à-dire stimulé par la faim et régulé par l'horloge interne de l'insecte. Ce comportement appétitif peut être soit passif, dans ce cas, l'insecte hématophage reste dans son gîte de repos, attendant des signaux véhiculés par le vent, ce qui permet de minimiser les pertes d'énergie, ou soit actif, dans ce cas, l'insecte hématophage se déplace aléatoirement jusqu'à détection d'un stimulus lui permettant de localiser un hôte. La seconde étape est l'activation par la perception de stimulus d'un hôte et l'orientation vers cet hôte. La sensibilité à des composants olfactifs semble être présente pour un grand nombre d'insectes hématophages (Chapman, 1988). Chez les *Culicoides*, il a été démontré que le CO₂, le 1-octèn-3-ol et la combinaison de ces deux composants ont un effet attractif (Mullens, 1995 ; Blackwell *et al.*, 1996 ; Bhasin *et al.*, 2000). Cependant, suite à une augmentation en concentration de CO₂, Grant & Kline (2003) observent une réponse neuronale beaucoup plus intense chez *Aedes aegypti* (Linnaeus) que chez trois espèces de *Culicoides*, suggérant que les moustiques ont un système sensoriel périphérique détectant des changements plus faibles de concentration de CO₂ que les *Culicoides*. Il est connu que l'attractivité d'un hôte dépend de sa taille, sans doute en rapport avec un dégagement de CO₂ et autres composés attractifs d'autant plus important que la taille augmente. Dans notre étude, pour contrôler ce facteur, nous aurions pu exposer plusieurs animaux de manière à obtenir des poids équivalents (c'est-à-dire 1 poney, 6 moutons, 6 chèvres, 4 génisses et 28 poules). Cependant, ce protocole n'a pas pu être retenu pour des raisons de disponibilité, de gestion des animaux et d'incapacité à analyser

la quantité correspondante de couvertures collantes. Nous avons opté pour un animal par espèce d'hôte (à l'exception des poules), puis standardisé les données d'abondance par le poids, la surface corporelle et le facteur d'allométrie de Kleiber. Nous avons obtenu les abondances maximales sur poney, c'est-à-dire sur l'hôte le plus gros, et donc qui doit dégager le plus de substances attractives. Cependant cette différence entre hôte reste flagrante malgré la correction des données par le poids, la surface corporelle ou le facteur de Kleiber. Ainsi, les hypothèses sont i) que les *Culicoides* capturés auraient une préférence réelle et forte pour les chevaux et/ou ii) que le facteur taille de l'hôte ne serait aucunement linéaire, avec la possibilité d'un effet seuil. En effet, on peut imaginer que le poney a, par sa corpulence, masqué le pouvoir attractif des autres hôtes présents et plus petits. Il serait souhaitable de répéter ces piégeages avec différents hôtes de même poids et d'étudier au sein d'une même espèce d'hôte, l'effet de la variation du poids.

La vision tient également un rôle important dans la phase finale de recherche d'hôte, le principal organe impliqué étant l'œil composé de l'insecte (Miller *et al.*, 1968). Les insectes distingueraient en premier l'odeur de l'hôte, puis, une fois proche de l'hôte et le contact visuel établi, la phase d'orientation débiterait (Sutcliffe *et al.*, 1995). Les insectes distinguent le contraste des couleurs, l'intensité du contraste, et les mouvements entre l'objet et l'arrière-plan. Braverman *et al.*, (2003) ont observé, par exemple, que *C. imicola* évite les zones blanches préférant se poser sur des parties du corps avec des zones de poils plus sombres. Les différences d'attraction peuvent provenir des différences de chaleur corporelle. Par exemple, Braverman *et al.*, (1988) ont capturé 72 % du total de *Culicoides* sur le ventre, zone ayant la température la plus élevée. Humphreys *et al.*, (1973) ont également analysé l'effet de la couleur de l'hôte (blanc et noir) sur l'attractivité. La couleur de l'hôte n'a, dans leur étude, aucun effet significatif sur l'attraction pour *C. guttipennis* et *C. sanguisuga*, les deux espèces les plus abondantes. Dans cette étude, les hôtes étaient de couleur différente, mais tous recouverts d'une couverture blanche limitant sans doute les différences de couleur entre hôtes. De plus, il semblerait que la forme soit un facteur important dans l'identification des hôtes par les *Culicoides*. Ainsi, alors que *C. brevitarsis* est connu pour être attiré par les bovins, Bishop *et al.* (2008) ont démontré que recouvrir une vache d'une couverture, qui modifie sa forme et certainement l'émanation d'odeur, diminue son attractivité. Nous avons pris le soin d'utiliser des patrons de couverture suffisamment ajustés pour ne pas modifier la forme des hôtes (à l'exception des poules). La taille de l'objet, qu'il soit hôte ou piège, apparaît importante dans l'attractivité. Viennet *et al.*, (2011) ont suggéré que la taille et la structure du *drop trap* pourrait expliquer en partie les captures abondantes de *Culicoides* obtenues avec ce piège. La taille des pièges a également été constatée comme influente sur le nombre de tabanides ou de simulies capturés (Thorsteinson and Bracken, 1965; Anderson and Hoy, 1972).

D'autre part, il peut exister des différences de sensibilité à lumière entre espèces. Par exemple, les espèces nocturnes de moustiques sont beaucoup plus sensibles à la lumière que les espèces diurnes (Land *et al.*, 1999). On peut donc s'attendre à des différences spécifiques chez les *Culicoides*. Ainsi, le piège à lumière ultraviolette peut sous-estimer ou surestimer le taux de piqûre selon les espèces de *Culicoides* (Carpenter *et al.*, 2008). Dans cette étude, nous avons montré que le piège à lumière ultra-violette surestimait le taux de piqûres de *C. obsoletus* mais sous-estimait celui de *C. scoticus*.

Dans la phase finale d'approche, l'insecte hématophage « décide » de se poser ou non et sélectionne une zone sur laquelle atterrir. Dans notre étude, *C. scoticus* et *C. dewulfi* ont été collectés abondamment sur la partie haute du poney (dos et tête), ce qu'avait précédemment observé Townley *et al.*, (1984) pour *C. dewulfi*. On peut supposer que la sélection d'une zone de pique est liée à des interactions entre espèces aboutissant à minimiser les compétitions pour l'accès à la ressource alimentaire. Ainsi, il est possible que ces sites changent en fonction de la diversité spécifique présente.

Une fois l'insecte hématophage posé sur l'hôte, celui-ci peut se gorger ou non en fonction du degré de « satisfaction » de l'insecte suite aux premières explorations et de l'intensité des mouvements de défense de l'hôte. Tanner et Turner (1974) ont montré que *C. arboricola* est attiré par les lapins et les dindes. En revanche, le taux de gorgement était bien plus important sur oiseau que sur mammifère, démontrant que cette étape de gorgement est importante à prendre en considération. Les mouvements de défense des hôtes et leurs intensités sont souvent dépendants de l'abondance des piqûres et de la gêne engendrée. Lorsque le pic d'activité d'une certaine espèce est à son maximum, l'abondance de ces piqûres peut, en provoquant des mouvements de défense chez l'hôte, limiter le succès du repas de sang. Si ces mouvements de défenses sont trop intenses, les insectes vont devoir s'adapter et changer d'hôtes pour assurer leur survie. Les petits vertébrés sont, en général, ceux qui souffrent le plus des piqûres des insectes et par adaptation, ils auraient développé des comportements de défense efficaces. Certaines espèces de moustique, par exemple *Culiseta melanura* (Coquillett), vecteur de l'encéphalite équine de l'est, en faible abondance au printemps et début de l'été, se nourrissent exclusivement sur passereaux. Plus tard dans la saison, l'abondance de ces moustiques augmente, leur spectre d'hôte devient alors plus large (Lehane, 2005). On peut s'attendre également, à ce que certaines espèces de *Culicoides*, en fonction du rythme d'activité saisonnière, soient plus abondantes et/ou plus agressives et provoquent des comportements défensifs chez l'hôte, les contraignant à cibler plusieurs espèces d'hôtes. Par ailleurs, il a été plusieurs fois observé que la génisse, la chèvre et plus rarement le mouton se couchaient, ce qui nécessairement a limité l'attaque des *Culicoides* au niveau des membres et du ventre, conditions que nous ne pouvions malheureusement pas contrôler.

Dans l'étude par approche indirecte, la préférence trophique des espèces paléarctiques de *Culicoides* a été qualifiée par l'identification de l'origine du repas de sang. Cette méthode a permis d'étudier un nombre de sites important et sur une grande échelle. Cependant, comme pour l'approche directe, elle est dépendante des outils utilisés pour échantillonner correctement les populations de femelles gorgées. Si la méthode la plus adaptée serait de capturer les femelles gorgées directement dans les gîtes de repos, le piège lumineux à lumière ultraviolette reste l'outil le plus utilisé. D'autre part, pour que l'étude de l'origine du repas de sang soit complète et non biaisée, il faudrait recenser précisément les hôtes présents sur le site, dans les alentours du piège et suivre un protocole standardisé ce qui est très rarement fait. Les facteurs limitant de cette méthode pour la compréhension du comportement trophique des femelles sont donc de ne donner qu'une information qualitative, de ne pas permettre de faire la différence entre les femelles gorgées sur un individu donné et celles gorgées sur des individus différents d'une même espèce d'hôte, de ne pas connaître

précisément les différents hôtes présents et enfin de ne pas utiliser les méthodes de piégeages appropriées et standardisées. Toutefois, cette méthode indirecte permet de présenter une liste d'hôtes sur lesquels une espèce donnée est capable de se gorger en conditions naturelles.

Le travail sur l'identification de l'origine du repas de sang a permis de présenter un outil facile à utiliser, rapide et approprié pour identifier l'origine du repas de sang d'espèces paléarctiques de *Culicoides* collectés dans 5 zones d'élevage (répartis entre les Pyrénées-Atlantiques et l'Ile-et-Vilaine). Les amorces spécifiques de ruminants domestiques (bovin, mouton, chèvre), ruminants sauvages (cerf, chamois, chevreuil), de chat, cheval, chien, cochon ont été dessinées, puis multiplexées pour le gène mitochondrial du *cytochrome b*. L'avantage de cette technique a été de pouvoir coupler pour la première fois l'identification des espèces de *Culicoides* (notamment jumelles) avec l'identification de l'origine des repas de sang pouvant être multiples. Sur toutes les femelles collectées, aucune ne s'est gorgée sur animaux sauvages. En revanche, les femelles *Culicoides* collectées se sont gorgées sur les hôtes majoritaires de l'exploitation à proximité de piège lumineux hormis des femelles *C. chiopterus* qui se sont gorgées sur des bovins absents des fermes échantillonnées. Nous observons ici deux tendances, un comportement opportuniste pour la majorité des femelles collectées et un comportement spécialisé pour les femelles *C. chiopterus*.

Chapitre 4 :

**Comportement des vecteurs de la fièvre catarrhale
ovine : endo/exophagie et rythme circadien des
Culicoides en Europe de l'Ouest**

Introduction du chapitre 4

Chez toutes les espèces animales, des organismes unicellulaires jusqu'à l'homme, une synchronisation de nombreuses fonctions internes aux cycles externes de l'environnement est assurée par les rythmes circadiens. Ces rythmes ont une périodicité d'environ 24 heures, sont sous dépendance de mécanismes endogènes appelés système circadien et entraînent des variations comportementales et physiologiques (Tomioka and Sakamoto, 2006). Chez les insectes, cela peut se manifester par des changements de comportement (activité de déplacement) ou des variations de sensibilité aux stimuli visuels ou olfactifs (Corbet, 1966). Le système circadien est composé de trois constituants : i) l'horloge interne, qui génère une rythmicité proche de 24 heures, ii) les photorécepteurs nécessaires à la synchronisation des rythmes endogènes sur les variations cycliques de l'environnement et iii) les systèmes effecteurs de l'horloge qui aboutissent à la régulation temporelle des rythmes physiologiques et comportementaux. L'information photopériodique est utilisée par les insectes pour percevoir, entre autres, les changements de saisons (Adkisson, 1966). Le rôle le plus important du système circadien est de programmer les phénomènes physiologiques et comportementaux de l'insecte à un moment opportun : anticipation des différents moments de la journée et des changements de saison pour optimiser l'activité de vol, d'accouplement, de recherche d'hôte, de gîte de ponte. La synchronisation avec le cycle environnemental est régulée essentiellement par le cycle jour/nuit (luminosité), et secondairement par la température (Tomioka and Sakamoto, 2006). D'autres facteurs météorologiques, comme le vent ou l'humidité relative, peuvent inhiber l'activité de vol et agir comme des facteurs perturbateurs de ces cycles.

Chez les *Culicoides*, le rythme circadien est peu décrit. Les espèces de *Culicoides* sont principalement décrites comme crépusculaires, pouvant poursuivre leurs activités pendant la nuit. Ainsi certaines espèces présentent deux pics d'activité, un juste après le lever du soleil et l'autre autour du coucher de soleil, à savoir *C. furens*, *C. barbosa* Wirth and Blanton (Kettle, 1969; Kettle, 1969 ; Lillie *et al.*, 1987), *C. impunctatus* (Kettle, 1969; Kettle, 1969 ; Blackwell, 1997) – ces trois espèces étant connues pour la nuisance provoquée par leur piqûre sur l'homme – *C. sonorensis* (Mullens, 1995), *C. fulvus*, *C. marksi* et *C. oxystoma* (Bellis *et al.*, 2004). Alors que d'autres sont plutôt nocturnes comme *C. peregrinus*, *C. bundyensis* et *C. brevitarsis* (Bellis *et al.*, 2004). Cependant, peu d'études ont décrit rigoureusement le rythme circadien sur 24 heures consécutives (Barnard and Jones, 1980; Lillie *et al.*, 1987). Utilisant un cheval comme piège à appât, Van der Rijt *et al.*, (2008) sont les seuls auteurs à avoir observé le rythme circadien de l'activité de recherche d'hôte de *Culicoides* européens. Ils ont constaté que *C. obsoletus* était plus actif au coucher du soleil et beaucoup moins au lever du soleil avec une activité rare pendant l'après-midi et la nuit (van der Rijt *et al.*, 2008).

On peut supposer que les heures d'activité de recherche d'hôtes sont sélectionnées pour maximiser le succès du repas sanguin, c'est-à-dire aboutir à une activité au moment où les hôtes sont disponibles et minimiser la mortalité au moment de ces déplacements. De même, l'endophagie, c'est-à-dire la capacité des insectes à pénétrer dans les bâtiments pour piquer leurs hôtes, peut être considérée comme une adaptation pour atteindre ces hôtes. Comprendre ce trait du comportement trophique des *Culicoides* a des conséquences importantes pour la

prévention et le contrôle des risques de transmission des pathogènes. Ainsi, *C. imicola*, le principal vecteur des virus de la peste équine et de la fièvre catarrhale ovine, est connu pour être une espèce nocturne et principalement exophage⁷ (Barnard, 1997; Meiswinkel *et al.*, 2000). Ainsi, en Afrique du Sud, rentrer les chevaux dans les écuries pendant la nuit a été une méthode pour prévenir l'infection des chevaux par le virus de la peste équine en réduisant le taux de piqûre de *C. imicola* (Barnard, 1997 ; Meiswinkel *et al.*, 2000). Peu d'études ont exploré ce caractère chez les espèces paléarctiques de *Culicoides*, et toujours en utilisant des pièges lumineux, dont on sait qu'ils ne représentent pas correctement le taux de piqûre.

Le succès de la recherche d'un hôte par un insecte hématophage va dépendre de la disponibilité et de l'accessibilité de l'hôte. Contrairement à un ectoparasite permanent, qui a sa source de nourriture à portée de proboscis, les insectes hématophages à l'état libre doivent localiser leur hôte et faire face à diverses contraintes environnementales (vent, pluie, variation de luminosité), comportementales (mouvements de défense des hôtes) ou physiques (bâtiments, courant d'air). Nous nous sommes intéressés à décrire, pour les espèces de *Culicoides* paléarctiques, le degré d'endo/exophagie, et le rythme circadien et sa dépendance aux facteurs environnementaux. Nous avons donc mené des captures à l'aide de deux types de pièges (*drop trap* et *suction trap*) appâtés avec un groupe de moutons, localisés dans une pâture, dans un bâtiment d'élevage largement ouvert et dans un autre bâtiment d'élevage dont les seules ouvertures étaient constituées de deux larges portes ouvertes à moitié. Au total, six sessions de capture chacune de 24 heures consécutives, ont été réalisées à trois périodes de l'année 2010 (avril/mai, juillet/août, septembre/octobre). Les résultats sont présentés sous la forme d'un article, qui est en cours de finalisation pour soumission dans le *Journal of Medical Entomology*.

⁷ Exophage : se nourrissant à l'extérieur

Host-seeking activity of bluetongue virus vectors: endo/exophagy and circadian rhythm of *Culicoides* in Western Europe

E. Viennet^{1*}, C. Garros¹, I. Rakotoarivony¹, X. Allène¹, L. Gardès¹, J. Lhoir¹, I. Fuentes¹, R. Venail², D. Crochet³, R. Lancelot¹, M. Riou³, C. Moulia⁴, T. Baldet¹, T. Balenghien^{1*}

¹ CIRAD, UMR Contrôle des Maladies, F-34398 Montpellier, France

² EID-Méditerranée, F-34184 Montpellier, France

³ INRA, UE1277 PFIE, Plate Forme d'Infectiologie Expérimentale, F-37380 Nouzilly, France

⁴ Université de Montpellier 2, ISEM équipe « Génomique interactive », F-34000 Montpellier, France

Corresponding author:

* CIRAD, Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes, Campus International de Baillarguet, TA-A15/A, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Phone: + 33-(0)4 67 59 38 56; elvina.viennet@cirad.fr or thomas.balenghien@cirad.fr

Abstract

Feeding success of free-living hematophagous insects is dependent on the insect ability to be active when hosts are available and to reach places where hosts are accessible. Diel timing of host-seeking activity and endophagy can be regarded as an adaptation of hematophagous insect to ensure temporal and spatial encounter with appropriate host. When the hematophagous insect is a pathogen vector, determining these components of host-seeking behavior is of primary interest for the assessment of transmission risk.

Our aim was to describe endo/exophagy and circadian host-seeking activity of Palaearctic *Culicoides* species, major biting pest and arbovirus vectors, using drop traps and suction traps baited with four sheep, as bluetongue virus hosts. Collections were carried out in three locations: field, largely-open stable and closed stable during six collection periods of 24 hours in April/May, in late June and in September/October 2010 in western France.

A total of 986 *Culicoides* belonging to 13 species, mainly *Culicoides brunnicans* Edwards and *Culicoides obsoletus* (Meigen), was collected on animal baits. *Culicoides brunnicans* was clearly exophagic, whereas *C. obsoletus* was able to enter into buildings. The outdoor/indoor ratio of *C. obsoletus* abundance was higher in summer than in spring and autumn, and was dependent on the building opening. In spring, *C. brunnicans* exhibited a bimodal pattern of host-seeking activity with peaks just after sunrise and sunset. *Culicoides obsoletus* was active before sunset in spring and autumn and after sunset in summer, illustrating influence of other parameters than light, especially temperature. Speed wind, temperature, sunlight, and atmospheric pressure seemed to influence host-seeking activity. Finally correlations between host-baited trap and UV-light/suction trap collections were assessed for both species.

Description of host-seeking behaviors allowed us to discuss control strategies for the transmission of *Culicoides*-borne pathogens, such as bluetongue virus. However, simple recommendations are too difficult to provide because of the variation in endophagy degree and time of host-seeking activity depending on *Culicoides* species, host abundance, season and weather conditions.

Keywords: *Culicoides*; host-seeking activity; endo/exophagy; circadian rhythm; bluetongue; Western Europe

Host-parasite systems are under contradictory selective processes, as parasite fitness is increased by a higher frequency of encounters with hosts and host fitness by avoiding these contacts (Combes, 2000). Feeding success of free-living hematophagous insects, which can be regarded as vertebrate parasites with periodic and short contacts, is dependent on the insect ability to be active when hosts are available and to reach places where hosts are accessible (Combes, 2010). Circadian and seasonal activities of insect are regulated by endogenous oscillators which are led by natural diel alternation of light and darkness (Clements, 1999). These biological clocks enable organisms to anticipate variations of biotic and abiotic factors associated with seasonal or diel progression rather than follow them (Tauber and Tauber, 1981; Clements, 1999). Diel timing of host-seeking activity should be selected to ensure temporal encounter of insect and host. Similarly, endophagy (the habit of obtaining the blood meal within a man-made structure (Clements, 1999)) can be regarded as an adaptation of hematophagous insect to reach hosts.

The description of circadian activity and endo/exophagy of hematophagous insects could have practical implications in control of diseases induced by pathogens they transmit. For instance, stabling horses at night in South Africa has been an environment friendly and costless method to prevent African horse sickness (AHS) in reducing bites of the main vector *Culicoides imicola* Kieffer known to be nocturnal and mainly exophagic (Barnard, 1997; Meiswinkel *et al.*, 2000). From 2006 to 2008, Europe faced a huge episode of bluetongue virus serotype 8 (BTV8) transmission leading to disastrous sanitary consequences in domestic ruminant populations and to important disruptions in animal trade (Wilson and Mellor, 2009). European regulations recommend the stabling of animals during *Culicoides* activity to reduce BTV transmission (EU Council Directive 2000/75/EC). The direct costs due to indoor housing of animals in The Netherlands in 2006, which was compulsory in restriction zones, were estimated to 18 Million Euros, *i.e.* 55% of total economic impact (Velthuis *et al.*, 2009), while endophagy of Palaearctic species was not precisely described.

Endophagous behavior of Palaearctic species was reported by Overgaard Nielsen and Christensen (1975) in Denmark. In late 2006, comparing UV-light trap collections inside and outside sheds in The Netherlands, Meiswinkel *et al.* (2008) collected threefold more *Culicoides* outside than inside, where cattle are kept for the night. The species suspected to be involved in BTV8 transmission, *i.e.* *Culicoides obsoletus* Meigen/*Culicoides scoticus* Downes and Kettle, *Culicoides dewulfi* Goetghebuer and *Culicoides chiopterus* (Meigen), were those mainly collected inside (Meiswinkel *et al.*, 2008). Using the same methodology in France at the same period, Baldet *et al.* (2008) collected mainly the same species inside stables, but in greater number inside than outside. Authors conceded that results are difficult to interpret because of the variation in building opening and in cattle abundance close to trap in the different collection sites (Baldet *et al.*, 2008). With a standardized approach, Baylis *et al.* (2010) identified that the presence of animals and the opening of stable increased the indoor number of *Culicoides* collected by UV-light trap. Moreover, authors highlighted that reduction of *Culicoides* number between outside and inside traps is greater in summer (6.5 fold) than in autumn (3 fold) (Baylis *et al.*, 2010). Unfortunately, all these studies used UV-light traps to assess *Culicoides* abundance, which are known to not assess correctly the biting

rate on animals (Carpenter *et al.*, 2008; Gerry *et al.*, 2009; Viennet *et al.*, 2011). Indeed, light attraction might lead to an overestimation of the *Culicoides* endophagy, due to a higher trapping efficiency of inside light traps compare to outside light traps (European Food Safety Authority, 2008).

Similarly, circadian cycles of Palaearctic species are poorly described. It is widely assumed that *Culicoides* are mostly crepuscular and may continue to be active throughout the night; however, many species are also troublesome in the day displaying two biting peaks: one after sunrise the other close to sunset. These hours of attack can lengthen when low-light, overcast conditions prevail leading to biting throughout the day in both open (*Culicoides impunctatus* Goetghebuer) and forested environments (*C. obsoletus*) (European Food Safety Authority, 2008). However, only few studies have described rigorously *Culicoides* nycthemeral cycles with consecutive 24h collections (Barnard and Jones, 1980; Lillie *et al.*, 1987), and only one has regarded host-seeking behavior of European *Culicoides* (van der Rijt *et al.*, 2008). Using horse-baited collections, the latter found that the largest number of *C. obsoletus* was collected at sunset, far less at sunrise and exceptionally in the afternoon and night.

The aim of this study was to describe circadian host-seeking activity and endo/exophagous behavior of Palaearctic *Culicoides* using host-baited trap collections. As insect behaviors are directly affected by geophysical (sun and moon light cycles) and climatic (temperature, humidity, wind) factors, we carried out collections in three different periods of the year.

Materials and methods

Study site and Culicoides collections

Indoor and outdoor collections were carried out during six collection periods of 24 hours in April/May, in late June and in September/October 2010 on an experimental farm (Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, UE1277 PFIE) breeding sheep and located at Nouzilly (47°33'01''N; 00°47'52''E) in western France. Three areas, separated by 30 m from each other, were investigated: a field (61 x 103 m), a closed stable (17 x 45 m) and a largely-open stable (30 x 10 m) (Fig. 1). The closed stable had closed windows (1 x 0.64 m; 30 windows west side and 12 east side) and two large doors (3.1 x 3.4 m) half open, thus about 3% of the walls were open surface. The largely open stable was constituted by 3 walls, 1 roof and 1 open side, and openings constituted about 38% of the wall surface. During collections, meteorological conditions (air temperature, relative humidity, wind speed and direction, solar radiation, rainfall and atmospheric pressure) were recorded every five minutes using a weather station Vantage Pro 2 (Davis Instruments France). Temperature and relative humidity were also recorded by Tiny Tag TGP-4500 data logger at each trap location. Monthly meteorological data recorded by national weather stations (Météo-France) at Parçay-Meslay (47°26'36''N; 00°43'36''E; 13 km from the study site) and at Saunay (47°35'24''N; 00°55'48''E; 11 km from the study site) in 2010 were used to illustrate meteorological

conditions during the year of collections and to complete data recorded by the local weather station.



Figure 1: Sketch map of the study site at Nouzilly (western France) with the location of the sheep-baited traps (drop trap and suction trap) in the three sites (field, large-open-stable, closed stable) and of the UV-light/suction trap.

We collected *Culicoides* using one drop trap and one suction trap in the field and in the closed stable, and one suction trap in the largely-open-stable (Fig. 1.). Sampling sites were separated by a minimum of 30 m to minimize interference between traps. The drop trap consisted of a rectangular cage (2.5 m wide x 3 m long and 2 m high) and made by white cotton netting ($< 0.25 \text{ mm}^2$ mesh size). Its structure and use was described in detail by Viennet et al. (2011). The suction trap consisted of a wood box (48 cm wide x 58 cm long and 73 cm high) equipped with a car fan at the top and an inside collection bottle rotator (model 1512, John W. Hock Company, Gainesville, FL). *Culicoides* were collected in 0.5 liter plastic collection bottles, containing two drops of soap in 1/3 of water, and then were transferred in 70% ethanol. Traps were operated during 24 consecutive hours (from 12 am to 12 am the next day), giving 48 collections of 30 min intervals, and 6 times at each of the three 2-week periods. Each trap was baited with four south-Prealpes sheep females of 3 to 5 years old and 55 to 65 kg weight enclosed in a pen (2.5 m long x 2 m wide x 1.3 m high). There were no horses or cattle within 200 m from the sites during the collection sessions. Each protocol step was conducted with respect to the standard ethical rules (staff was qualified for animal experimentation, premises are licensed for experiment, protocol procedure does not cause any pain, *i.e.* no injection, no biological sample, no surgery).

In parallel, a UV-light/suction trap (manufactured by the Onderstepoort veterinary institute in South Africa) was operated during each collection session to have an overview of the *Culicoides* diversity. It was running with an 8W UV light tube and on a 12-volt car battery and placed at 1.5 m height from the ground on a tree invisible from the animal baits (figure 1). The insects collected with the UV-light/suction trap were stored in 70% ethanol.

***Culicoides* identification**

All *Culicoides* were morphologically identified under stereomicroscope (Stemi 2000C ZEISS) to species level based on identification key for the Palaearctic region (Delécolle, 1985) and sorted by sex. Females were classified as nulliparous, parous (Dyce, 1969), freshly blood-fed and gravid. When morphological identification with stereomicroscope was not possible, individuals were dissected and identified using microscopic slide preparations (ZEISS imager A.1 fluorescence microscope).

Individuals belonging to the Obsoletus Complex (*C. obsoletus* and *C. scoticus*) were molecularly identified following the assay developed by Nolan et al. (2007). To fulfill a need of high-throughput sample testing, DNA extraction kits based on the 96-well plate format have been developed for tissue, blood samples and using Chelex resin (50 µL/*Culicoides*) before polymerase chain reaction (PCR) (Solano *et al.*, 1997). Primers and PCR amplifications conditions were as described by Nolan et al. (2007).

Statistical analysis

Outdoor activity of *Culicoides* was compared between periods of the year to highlight influence of day length on circadian activity and was compared with climatic conditions to assess influence of meteorological parameters on host-seeking activity.

Abundance of *Culicoides* species were modeled using a Poisson generalized linear mixed model. We used session (1 to 18) as random effect, and location (field, closed stable and largely-open-stable), trap (DT, ST) and season (spring, summer and autumn) as potential fixed effects. We considered also interactions between location and season, as endophagic behavior may change between the different seasons (Baldet *et al.*, 2008; Baylis *et al.*, 2010). Selection of effects and/or interactions in abundance model was based on the calculation of the Pearson's product-moment correlation between fitted and observed female abundance and of the Akaike information criterion. Then analyzes of variance were performed to compare models two by two and to assess importance of each selected effect and interaction.

Finally, we compared outdoor biting rates assessed by the host-baited traps with the abundance in UV-light collections by calculating Pearson correlation coefficients.

All data analyses were performed using the R statistical package (R Development Core Team, 2008).

Results

Climatic data

Climate in the study site was oceanic, with mean annual temperature of 11.4°C, thermal amplitude of 14.9°C and annual rainfall of 694 mm (Météo-France data, 1971-2000). In 2010, annual rainfall was lower than for the 1971-2000 period (586 mm), with deficit in rainfall during the first part of the year (179 mm between January and May 2010 *versus* 298 mm for the reference period). Temperatures were generally closed to normal values in 2010, with colder values in January and December and warmer in June and July (Fig. 2A).

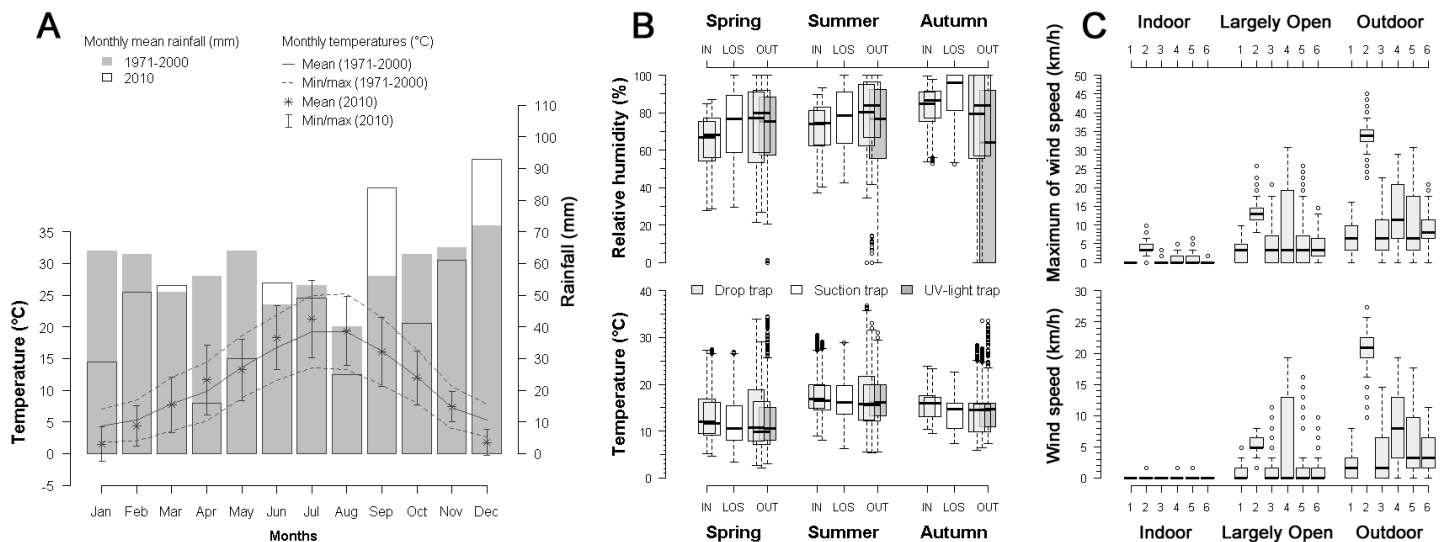


Figure 2: Climatic conditions in the study site: A. Ombrothermic diagram for comparison between 2010 and the 1971-2000 period (data from Météo-France station of Parçay-Meslay); B. Boxplots of temperature (°C) and relative humidity (%) recorded by data loggers at each location during the 15 collection sessions; C. Boxplots of mean and maximum wind speed (km/h) recorded by the local weather station during each of the 6 summer collections.

During collection sessions, temperatures were higher in summer than in autumn and spring, with smaller amplitude in autumn, whereas humidity was higher in autumn than in summer and spring (Fig. 2B). The temperature decreased gradually from indoor to outdoor, humidity showed the inverse tendency. In autumn, however, the relative humidity was the highest in the largely-open-stable (Fig 2B). Amplitudes of temperature and humidity were always higher outdoor than in other locations, with numerous outlier observations, especially in autumn, probably due to direct exposure to the sun. Wind speeds were correlated between locations, with an expected wind gradient from outdoor to indoor, with an intermediary situation for the largely-open-stable (Fig. 2C).

Diversity and seasonality

During the 18 collection sessions, a total of 986 *Culicoides* (948 females and 38 males) belonging to 13 species were collected in host-baited traps (drop trap and suction trap) and 539 *Culicoides* (451 females and 88 males) belonging to 19 species in the UV-light/suction trap (Table 1). Molecular assay was performed on 407 *Culicoides* females morphologically identified as belonging to the Obsoletus Complex. The sample contained 349 *C. obsoletus*, 25 *C. scoticus*, 6 *C. dewulfi* and 1 *C. chiopterus*; 26 individuals were not identified. Only 4% of *Culicoides* collected in host-baited traps were males – mainly the dominant species *Culicoides brunnicans* Edwards collected by the drop trap – against 20% in UV-light/suction trap. A total of 84 gravid females were collected, all in the suction trap (mainly (47%) in summer and most (76%) are *C. obsoletus*). Blood-fed females were collected by all traps, but mainly by the drop trap (4 in suction trap, 197 in drop trap and 9 in the UV-light/suction trap). The majority of blood-fed females (196/210) belonged to the dominant species *C. brunnicans* and *C. obsoletus*; the engorgement rate in drop trap was 28% for *C. brunnicans* and 65% for *C. obsoletus*.

Diversity and abundance of species varied across seasons and traps. *Culicoides brunnicans* was present quasi exclusively in spring (Table 1). *Culicoides obsoletus* was present the three periods, mainly in summer period (Table 1). The abundance of *C. scoticus* decreased progressively from the first to the last collection period (Table 1). *Culicoides brunnicans* was more abundant in host-baited traps than in UV-light/suction trap, whereas the opposite situation was observed for *C. obsoletus*. Moreover, UV-light trap collected some species rarely or not collected in host-baited traps, as *Culicoides punctatus* Latreille and *Culicoides festivipennis* Keiffer. On the contrary *C. dewulfi* and *C. chiopterus* were found in host-baited traps but not in UV-light/suction trap (Table 1).

Table 1. Numbers of *Culicoides* collected over 18 sessions in spring, summer and autumn by host-baited traps and UV-light/suction trap

Location	R ¹	Species	Host-baited traps															UV-light/suction trap																
			Total		Suction Trap						Drop Trap							Total		Spring			Summer			Autumn								
			F ²	M	F	P	F	P	M	F	P	M	F	P	M	F	P	M	F	P	M	F	P	M	F	P	M							
OUTDOOR	Field	1	<i>C. brunnicans</i>	592	24	111	11							475	50	24	6	67							140	62	126	5	62	14	93			
	2	<i>C. obsoletus</i>	193	3	31	55	61	54		27	63	2	17	65		42	60	1	15	40				186	16	17	59		95	43	3	74	38	13
	3	<i>C. scoticus</i>	43		29	81	5	40		2			6	83					1					29	2	18	33		8	75		3		2
	4	<i>C. punctatus</i>	4	1	1		1				1					1			1				27	4				7	57		20	80	4	
	5	<i>C. festivipennis</i>																				22						11	100		11	91		
	6	<i>C. pulicaris</i>	8		2		1						5	40									12	1				12	50	1				
	7	<i>C. dewulfi</i>	16		5		3			6	33		1			1																		
	8	<i>C. chiopterus</i>	10		4		5	100								1																		
	9	<i>C. poperinghensis</i>	2													2							6		6									
	10	<i>C. achrayi</i>																					4					4						
	10	<i>C. lupicaris</i>	1				1																3		2			1						
	10	<i>C. vexans</i>	3		2								1										1		1									
	13	<i>C. nubeculosus</i>	3							1						1			1															
	13	<i>C. simulator</i>																					3					3						
	15	<i>C. kibunensis</i>																					2					2						
	15	<i>C. santonicus</i>	1		1																		1	2	1		2							
	17	<i>C. fascipennis</i>																					1								1			
	17	<i>C. pictipennis</i>																					1		1									
	17	<i>C. salinarius</i>																					1								1			
	17	<i>C. puncticollis</i>																						1								1		
		Obsoletus Complex	24		3		9	67		2			9	55		1							10		1			6	83		3			
		Pulicaris Group		1							1																							
	Total Field			900	29	189		86		38		4	514		24	55		1	18				451	88	174		64	164		4	113		20	
INDOOR	Largely open stable	1	<i>C. brunnicans</i>	1		1																												
	2	<i>C. obsoletus</i>	13	2	1		3		9	56	2																							
	3	<i>C. scoticus</i>	4		2				2																									
	7	<i>C. dewulfi</i>	1						1																									
	17	<i>C. newsteadi</i>	1				1																											
		Obsoletus Complex	1				1																											
	Total Largely open stable			21	2	4		5		12		2																						
	Closed stable	1	<i>C. brunnicans</i>	2		1							1																					
	2	<i>C. obsoletus</i>	18	4	8	25	1		1	7			1				3	1																
	3	<i>C. scoticus</i>	2	2	1				1	1								1																
	4	<i>C. punctatus</i>	1																1															
8	<i>C. chiopterus</i>	3	1			3											1																	
	Obsoletus Complex	1													1																			
Total Closed stable			27	7	10		4		2	8		2		1		5	2																	
TOTAL			948	38	203		95		2	58		6	516		24	56		6	20		451	88	174		64	164		4	113		20			

¹ R: species rank calculated with the total number of individuals whatever the trap and the season.

² F: females; (P): parity rate as No. parous/No. females (given in percentage if F > 5); M: males. For the sake of clarity, 0 were not quoted.

Endo/exophagy

The best model predicting the observed abundance of *Culicoides* (Pearson's product-moment correlation, $r = 0.98$) was the complete model including location, season, interactions between both and trap as fixed effects and the session as random effect, even if season had not a clear effect on abundance (Table 2). Most of *Culicoides* females were collected outdoor (mean predicted number of *Culicoides* of 8.5 outdoor *versus* between 0.4 and 1.0 indoor) and mainly by the drop trap (4.2 *versus* 2.4).

Table 2. Mean No. observed (max) and predicted *Culicoides* for all species and the most abundant species depending on the trap, the location and the season

Effect	Value	All species		<i>C. brunnicans</i>		<i>C. obsoletus</i>		<i>C. scoticus</i>		<i>C. dewulfi</i>	
		Observed	Pred ³	Observed	Pred	Observed	Pred	Observed	Pred	Observed	Pred
Trap	Drop trap	16.4 (249)	<u>4.18</u> ^{***}	13.4 (237)	<u>1.94</u> ^{***}	2.1 (19)	<u>0.91</u> ^{***}	0.2 (4)	<u>0.04</u> ^{***}	0.1 (1)	<u>0.04</u> [*]
	Suction trap	6.6 (99)	<u>2.37</u>	2.1 (63)	<u>0.45</u>	2.7 (28)	<u>1.62</u>	0.8 (25)	<u>0.22</u>	0.3 (3)	<u>0.26</u>
Location	Outdoor	25.0 (249)	<u>8.46</u> ^{***}	16.4 (237)	<u>3.55</u> ^{***}	5.4 (28)	<u>3.09</u> ^{***}	1.2 (25)	<u>0.34</u> ^{***}	0.4 (3)	<u>0.41</u>
	LOS ²	1.2 (6)	<u>0.99</u> ^{**}	0.1 (1)	<u>0.03</u>	0.7 (4)	<u>0.39</u>	0.2 (2)	<u>0.04</u>	0.1 (1)	<u>0.03</u>
	Indoor	0.8 (6)	<u>0.38</u>	0.1 (1)	<u>0.01</u>	0.5 (5)	<u>0.32</u>	0.1 (1)	<u>0.02</u>	0.0	<u>0.00</u>
Season	Spring	24.0 (249)	5.62	19.6 (237)	<u>3.55</u>	1.9 (14)	<u>0.89</u>	1.3 (25)	-	0.2 (3)	-
	Summer	5.0 (34)	2.03	0.2 (3)	<u>0.04</u>	3.6 (28)	<u>1.53</u> ^o	0.2 (2)	-	0.1 (0)	-
	Autumn	2.6 (18)	2.17	0.0	<u>0.00</u>	2.0 (14)	<u>1.38</u>	0.2 (1)	-	0.2 (2)	-
Sea*loc¹	-	p < 0.001		-	p < 0.001		-	-		-	-

¹ Interaction between season and location

² LOS: largely open stable; Pred: predicted values; NS: not significant

³ Predicted values (Pred) are in bold and underlined if analyze of variance between models with and without that effect showed significant differences with $\alpha = 0.05$. P-values were given for effect modalities compared to a reference value, *i.e.* "suction trap" for trap, "indoor" for location and "autumn" for season (*** p < 0.001; ** p < 0.01; * p < 0.05; ^o p < 0.1, no indication p > 0.1)

The best model predicting *C. brunnicans* abundance ($r = 0.99$) was the complete model without the interaction term (Table 2), indeed this species was found quasi exclusively during the first collection period. *Culicoides brunnicans* was collected quite exclusively outdoor (between 100 and 300 fold more abundant outdoor than indoor) and mainly by the drop trap (1.9 *versus* 0.5). Interaction between location and season was needed to obtain the best prediction of *C. obsoletus* abundance ($r = 0.91$). *Culicoides obsoletus* was more collected outdoor (between 8 and 10 fold more abundant outdoor than indoor) and by the suction trap (1.6 *versus* 0.9 by the drop trap). Interaction between location and season influenced the prediction of *C. obsoletus* abundance (p < 0.001). Indeed, differences between indoor and outdoor collections of *C. obsoletus* varied across season (Fig. 3). *Culicoides obsoletus* was predicted to be 5 fold more abundant outdoor than in the closed stable (30 fold than in the largely open stable) during spring, 100 fold (20 fold) during summer and 5 fold (3 fold) during the autumn (Fig. 3). For *C. scoticus* and *C. dewulfi*, only trap and location as fixed effect were needed to obtain parsimonious and good-fitting models ($r = 0.98$ and $r = 0.72$). Both species were more collected by the suction trap (0.22 and 0.26 *versus* 0.04 and 0.04),

and *C. scoticus* was more collected outdoor (between 9 and 22 fold more abundant outdoor than indoor).

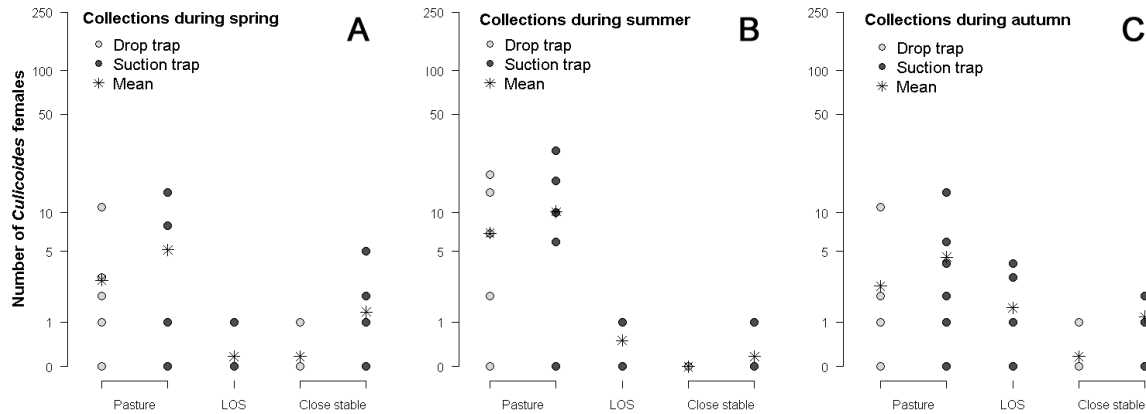


Figure 3: Abundance of *Culicoides obsoletus* according to the trap and the location in spring (A), summer (B) and autumn (C). LOS: largely open stable

Circadian host-seeking activity

During collections, the time of sunrise ranged from 6h49 (GMT + 1) the 26th April to 8h06 the 8th October, when the sunset ranged from 21h01 to 19h24 between the same dates.

During spring, *C. brunnicans* exhibited clearly two peaks of activity. The host-seeking activity increased rapidly just after sunrise, and then slowly decreased during the next 5 hours. Host-seeking activity started again 5 hours before the sunset, reaching a peak just after sunset and then decreasing rapidly (Fig. 4).

Host-seeking activity of *C. obsoletus* was recorded mainly around sunset. In spring and autumn, host-seeking activity started slowly 2 hours before sunset, peaked just before sunset and then decreased rapidly (Fig. 4). In summer, we observed the same shape of host-seeking activity except that the peak occurred just after sunset. A slight host-seeking activity was recorded around sunrise, especially in autumn. Outside these 2 periods, host-seeking activity was quite absent. The surprising peak observed in the middle of the afternoon (15h20) was the result of one single collection with the drop trap.

The same pattern, *i.e.* host-seeking activity mainly around sunset and slightly around sunrise, was observed for *C. dewulfi*, *C. chiopterus* and *C. scoticus*, even if the low number of females collected did not allow representing the daily host-seeking activity.

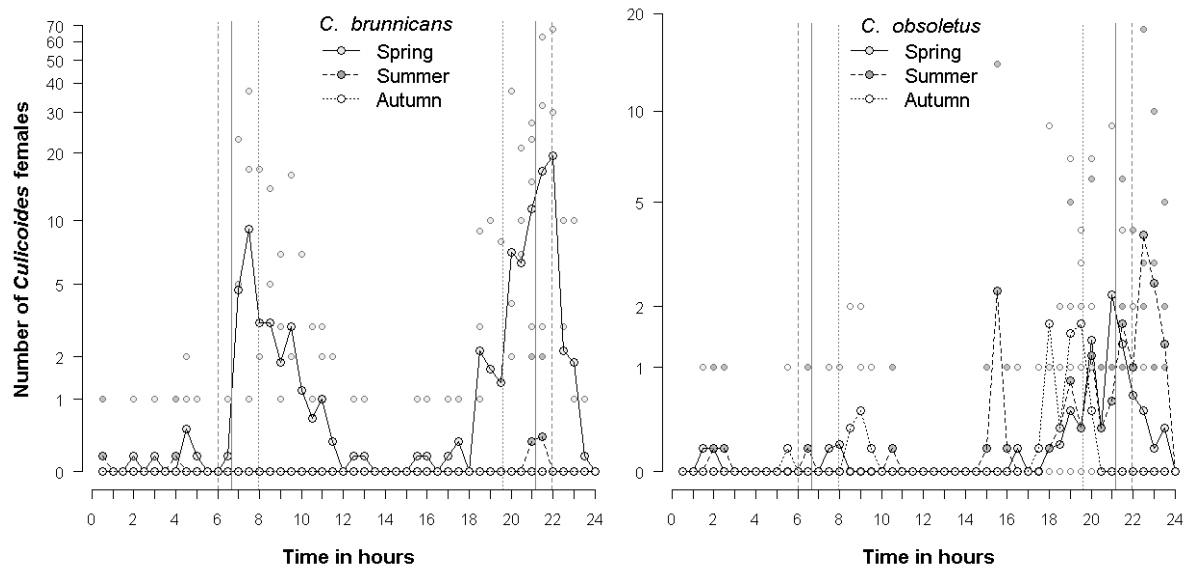


Figure 4: Circadian host-seeking activity of *C. brunnicans* and *C. obsoletus*: Total number of females collected outdoor by host-baited traps at each session and day time. Small symbols are single collection and lines with large symbols the means by period. Vertical lines symbolize the time of sunrise and sunset.

Due to technical problems, we did not have meteorological parameters recorded locally for all collection sessions. Thus, we first compared available local data with the records of Météo-France weather stations. Correlations were excellent for temperatures and satisfactory for all other meteorological parameters, except for wind and rainfall which may have been affected by local events. Comparing *Culicoides* abundance with Météo-France records, we highlighted that *Culicoides* were collected in a large range of temperature (Fig. 5): single individuals were collected at low temperatures (3.2 °C was the minimum) and first important catch (60 *Culicoides*) with low temperatures was recorded at 7.8 °C. Low relative humidity did not seem to inhibit host-seeking activity (Fig. 5) as 47 *Culicoides* were collected at 26% of humidity. The first important catch (20 *Culicoides*) with strong wind was done with wind speed of 8.2 m/s, but differences observed between winds recorded locally and by Météo-France station, limited confidence in this threshold (Fig. 5). Almost all the collections were carried out without any rainfall event recorded locally or by Météo-France stations. Most of the *Culicoides* were collected with an atmospheric pressure comprised between 1,013 and 1,018 HPA. Finally, *Culicoides* were rarely collected when solar radiation exceeded 130 J/cm², and collections were maximal with low values of solar radiation (Fig. 5).

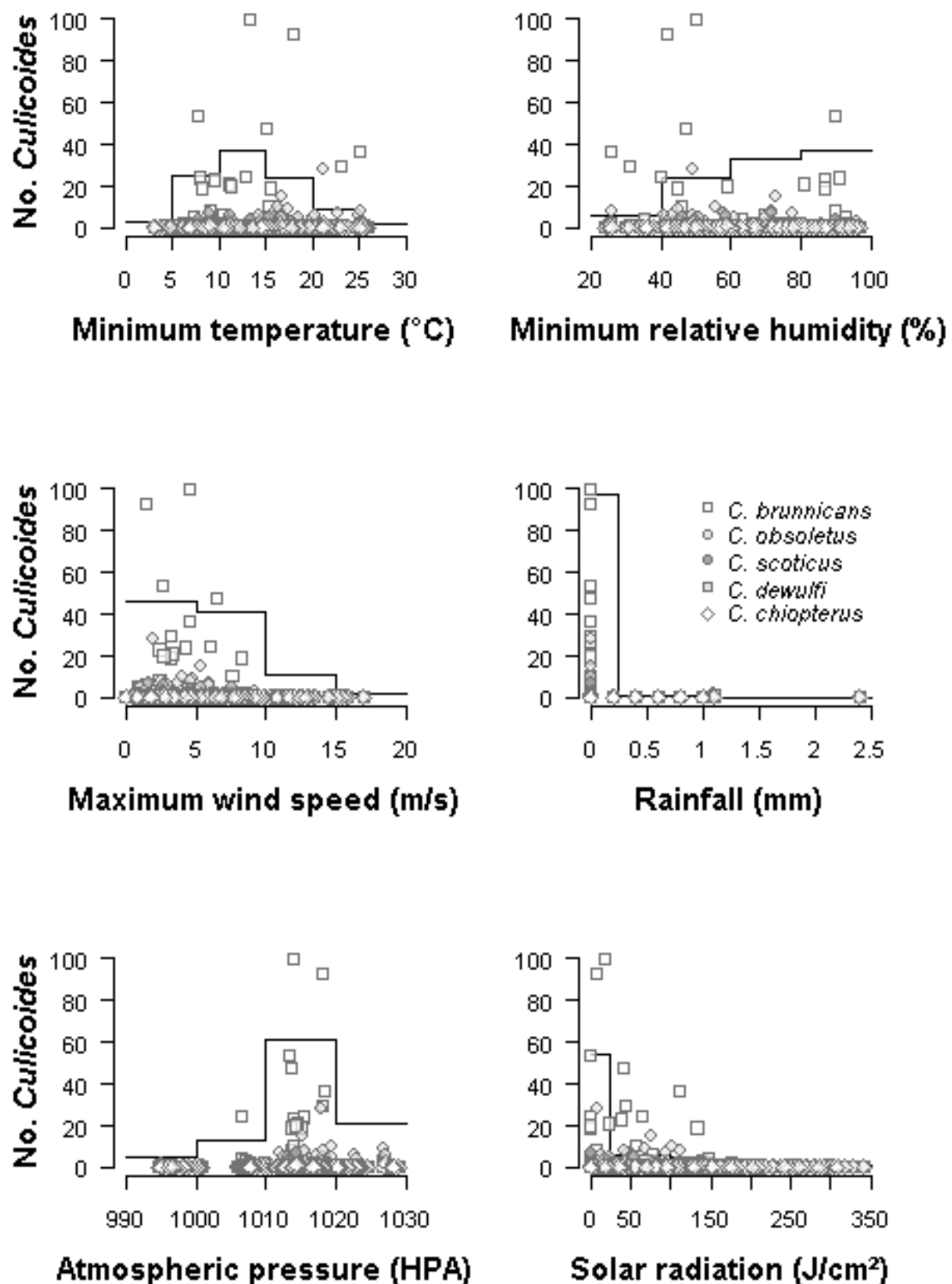


Figure 5: Number of *Culicoides* collected outdoor in host-baited traps compared to meteorological parameters recorded by MétéoFrance weather stations located at Parcay-Meslay or at Saunay. Lines are the distribution histogram of meteorological parameters recorded during the collections.

Culicoides brunnicans biting rates in spring assessed by drop trap or suction trap was linearly correlated with the abundance in UV-light/suction trap ($R^2 = 0.74$), but some collections were positive in host-baited traps but not in UV-light/suction trap, or conversely (Fig. 6). Correlation was slighter for *C. obsoletus*, even if it seemed that UV-light/suction trap tended to over-estimate biting rates.

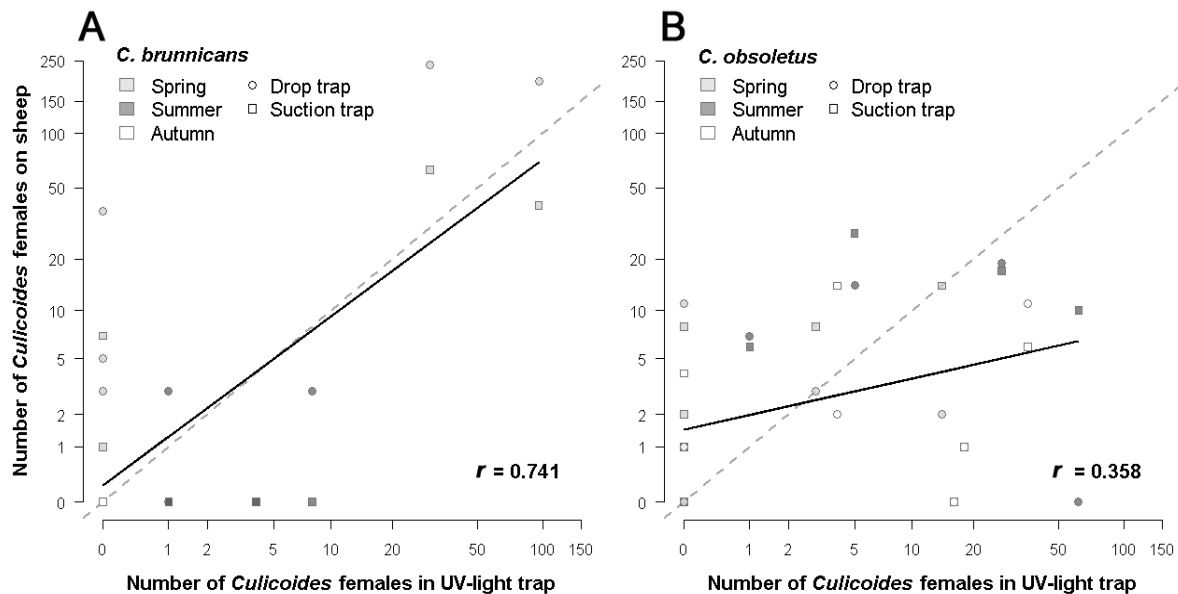


Figure 6: Correlation between the numbers of *C. brunnicans* and *C. obsoletus* collected outdoor in host-baited traps and in UV-light/suction trap.

Discussion

We described endo/exophagy and circadian host-seeking activity of Palearctic *Culicoides* species using drop trap and suction trap collections. The trap, as fixed effect, was necessary to model abundances of all *Culicoides* species. The drop trap collected more *C. brunnicans* than the suction trap – Viennet et al. (2011) showed that drop trap collected more *C. brunnicans* than other host-baited trap methods – but abundances assessed by both methods were perfectly correlated (Pearson's coefficient $r = 0.99$). The suction trap collected more individuals of other species than the drop trap, and presence of gravid females suggested that this trap may have collected non host-seeking females. Moreover, differences between traps may reflect spatial variations of *Culicoides* populations. However, satisfactory concordance of abundance ($r = 0.67$) or parity for *C. obsoletus* in both trap suggests that suction trap could be used as an efficient and easy alternative to drop trap.

To date, investigations of *Culicoides* endo/exophagy had been carried out always with UV-light/suction traps (Anderson et al., 1993; Barnard, 1997; Meiswinkel et al., 2000; Baldet et al., 2008; Meiswinkel et al., 2008; Calvete et al., 2009; Baylis et al., 2010), with the

exception of one study (Votypka *et al.*, 2009) on ornithophilic *Culicoides* species. But UV-light/suction trap collections were greatly dependent on local conditions, such as presence and number of animals in the vicinity of trap (Garcia-Saenz *et al.*, 2011), leading to complicated interpretations. For instance, *C. imicola* was collected in greater number by indoor animal-baited light traps than by outdoor unbaited light traps in Spain (Calvete *et al.*, 2009), in apparent contradiction with the classical description of this species as exophagic (Barnard, 1997; Meiswinkel *et al.*, 2000). In our study, host-baited collections in outdoor and indoor conditions (with two degrees of opening) highlighted that Palaearctic *Culicoides* are primary exophagous insects, some species being strictly exophagous, as *C. brunnicans*, some others showing a degree of endophagy, as *C. obsoletus* or *C. scoticus*. We showed that the number of *Culicoides* entering into building was higher in largely open stable than in closed stable, confirming previous observations (Barnard, 1997; Meiswinkel *et al.*, 2000; Baylis *et al.*, 2010). Baylis *et al.* (2010) showed that differences between outdoor and indoor catches decreased from summer to autumn. To explain these differences, authors suggested factors difficult to untangle. On one hand, the colder temperatures and stronger wind observed in autumn could suppress outdoor *Culicoides* host-seeking activity – overcast conditions have been shown to decrease outdoor UV-light/suction collections (Meiswinkel *et al.*, 2000; Meiswinkel *et al.*, 2008). On the other hand, autumnal conditions could also interfere in light trap efficiency – wind could modify the suction trap efficiency – or host-seeking activity could occur mainly before sunset in late year decreasing part of *Culicoides* which would be collected (Murray, 1987; Kettle *et al.*, 1998). We observed the same variations in difference between outdoor and indoor collections across seasons (9.1 fold in spring, 36.2 in summer and 3.8 in autumn), whereas autumnal collections were equally or less windy than the other collections. Thus, the degree of endophagy of *C. obsoletus* seemed to vary across the year. However, the number of sheep grazing around the study site was lower in autumn than in the other periods potentially enhancing *Culicoides* to enter into the shed to blood feed. Finally, the presence of few gravid *C. obsoletus* indoor suggest that some females may enter into shed to oviposit, as illustrated by the possibility to find *Culicoides* larvae indoor (Zimmer *et al.*, 2010; Ninio *et al.*, 2011).

It is widely assumed that *Culicoides* are mostly crepuscular (Mellor *et al.*, 2000). However, only few studies have described rigorously *Culicoides* circadian cycles with consecutive 24h collections (Kettle, 1969; Barnard and Jones, 1980; Lillie *et al.*, 1987), and only one has regarded host-seeking behavior of European *Culicoides* using horse-baited collections (van der Rijt *et al.*, 2008). Two patterns of host-seeking activity were observed during our 24 consecutive hours of collection. *Culicoides brunnicans* showed a bimodal pattern of host-seeking activity with peaks at dawn and dusk, as found by Blackwell *et al.* (1997) for flight activity of *C. impunctatus*. Other species, *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* and *C. chiopterus*, showed a main activity around sunset, even if some individuals could be collected around sunrise. We cannot exclude that in context of higher abundance, these species present a second, but lower peak of host-seeking activity around sunrise, as highlighted by Van der Rijt *et al.* (2008) for *C. obsoletus* (84 individuals collected at sunset *versus* 10 at sunrise). Meteorological conditions are known to impact adult midge activity

(Kettle, 1969; Mellor *et al.*, 2000). It seems clear that windy conditions suppress the flight activity of *Culicoides* (Kettle, 1969; Blackwell, 1997; Meiswinkel *et al.*, 2000). Flight activity is described as exceptional at temperatures inferior to 10 °C and optimal at temperatures superior to 20 °C (Tsutsui *et al.*, 2010). Finally, Blackwell *et al.* (1997) found positive correlation between flight activity of *C. impunctatus* females and relative humidity and rainfall. During our observations, relative humidity was not found to influence host-seeking activity and minimal temperature required seemed lower than described by Tsutsui *et al.* (2010), *i.e.* 8 °C, illustrating a probable specific variation. We found that the highest host-seeking activity for low, but not null sunlight corresponding to twilight periods. Changes in light intensity during the day could explain “abnormal” host-seeking activity. For instance, 15 *C. obsoletus* were collected in the middle of the afternoon (at 15h20) one day of June (Fig. 4). During this afternoon, sunlight decreased from 120 (14h00) to 77 (15h00) and to 20 J/cm² (16h00), compared to means of 226 (14h00), 224 (15h00) and 225 (16h00) the other collection days of June. The first consequence is the possible lengthening of *Culicoides* attack hours when low-light overcast conditions prevail leading to biting throughout the day, as known in both open for *C. impunctatus* or in forested environments for *C. obsoletus* (European Food Safety Authority, 2008). The other consequence is the possible host-seeking activity of *Culicoides* during night due to moon illumination, as demonstrated by Barnard and Jones (1980) or Lillie *et al.* (1987). Therefore, it would be interesting to study influence of moon light and moon phases on circadian host-seeking activity of Palaearctic *Culicoides*. Sunset and sunrise times depend on locality and season, leading to a change in host-seeking activity times throughout the year. Moreover, *C. obsoletus* was found active before sunset during spring and autumn, and after sunset during summer, illustrating influence of other parameters than sunlight. This could be an adaptation to temperatures as suggested by Lillie *et al.* (1987) who found the same pattern change throughout the year. Finally, it would be interesting to carry out further investigations on the influence of atmospheric pressure, a parameter rarely explored, but that could influence host-seeking activity as suggested by our observations.

Finally, this work allowed the comparison of biting midge abundance in sheep-baited traps and in UV-light /suction trap, operated as standardized method. Due to experimental design, these methods could not be rigorously compared. A correlation, close to the bisector, could be established for *C. brunnicans*, showing that UV-light collections may be used without correction to follow changes in biting rates. Correlation was worse for *C. obsoletus*, but the tendency of biting rate over-estimation by the UV-light/suction trap was already recorded by Carpenter *et al.* (2008) and Viennet *et al.* (2011 ; submitted).

To conclude, in farms with grazing animals, keeping some valuable animals in closed stable would limit their risk to be bitten by *Culicoides* and then to be infected by *Culicoides*-borne pathogens, as biting midges seem to be primary exophagic insects. However, simple recommendations are too difficult to provide because of the variation in endophagy degree and time of host-seeking activity depending on *Culicoides* species, host abundance, season and weather conditions. This is a consequence of evolutionary processes selecting the ability of hematophagous insects to ensure host encounter in time and space.

Acknowledgements

We are particularly grateful to the co-operators on whose premises this work was conducted. From the Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale (PFIE) Inra Nouzilly, we would like to thank his director Bertrand Schwartz, and all people who gave assistance in operating traps on several nights (technicians, animal keepers, shepherds), especially P. Sarradin for his involvement in this project. This study was funded partially by CIRAD, by the Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire and by the EU FP7-HEALTH-2010-single-stage grant 261504 EDENext. This paper is catalogued by the EDENext Steering Committee as EDENextxxx (<http://www.edenext.eu>). The contents of this publication are the sole responsibility of the authors and do not necessarily reflect the views of the European Commission.

References

- Anderson, G. S., P. Belton, and E. M. Belton. 1993.** A population study of *Culicoides obsoletus* Meigen (Diptera, Ceratopogonidae), and other *Culicoides* species in the Fraser Valley of British-Columbia. Canadian Entomologist 125: 439-447.
- Baldet, T., J. C. Delécolle, C. Cetre-Sossah, B. Mathieu, R. Meiswinkel, and G. Gerbier. 2008.** Indoor activity of *Culicoides* associated with livestock in the bluetongue virus (BTV) affected region of Northern France during autumn 2006. Preventive Veterinary Medicine 87: 84-97.
- Barnard, B. J. H. 1997.** Some factors governing the entry of *Culicoides* spp. (Diptera : Ceratopogonidae) into stables. Onderstepoort Journal of Veterinary Research 64: 227-233.
- Barnard, D. R., and R. H. Jones. 1980.** Diel and seasonal patterns of flight activity of Ceratopogonidae in Northeastern Colorado: *Culicoides*. Environmental Entomology. 9: 446-451.
- Baylis, M., H. Parkin, K. Kreppel, S. Carpenter, P. S. Mellor, and K. M. McIntyre. 2010.** Evaluation of housing as a means to protect cattle from *Culicoides* biting midges, the vectors of bluetongue virus. Medical and Veterinary Entomology 24: 38-45.
- Blackwell, A. 1997.** Diel flight periodicity of the biting midge *Culicoides impunctatus* and the effects of meteorological conditions. Medical and Veterinary Entomology 11: 361-367.
- Calvete, C., R. Estrada, M. A. Miranda, R. del Rio, D. Borrás, F. J. Beldron, A. Martínez, A. J. Calvo, and J. Lucientes. 2009.** Entry of bluetongue vector *Culicoides imicola* into livestock premises in Spain. Medical and Veterinary Entomology 23: 202-208.
- Carpenter, S., C. Szmargd, J. Barber, K. Labuschagne, S. Gubbins, and P. Mellor. 2008.** An assessment of *Culicoides* surveillance techniques in northern Europe: have we underestimated a potential bluetongue virus vector? Journal of Applied Ecology 45: 1237-1245.
- Clements, A. N. 1999.** The biology of mosquitoes. Sensory reception and behaviour. CABI, New York.
- Combes, C. 2000.** Selective pressure in host-parasite systems. Journal de la Société de Biologie 194: 19-23.
- Combes, C. 2010.** L'art d'être parasite: les associations du vivant, Paris.
- Delécolle, J.-C. 1985.** Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France, pp. 238. Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.

- Dyce, A. L. 1969.** The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *Journal of the Australian Entomological Society* 8: 11-15.
- European Food Safety Authority, E. F. S. A. 2008.** Bluetongue Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (Question No EFSA-Q-2007-201) adopted on 19 June 2008. *The EFSA Journal* 735: 1-70.
- Garcia-Saenz, A., P. McCarter, and M. Baylis. 2011.** The influence of host number on the attraction of biting midges, *Culicoides* spp., to light traps. *Medical and Veterinary Entomology* 25: 113-115.
- Gerry, A. C., V. S. I. Monteys, J. O. M. Vidal, O. Francino, and B. A. Mullens. 2009.** Biting rates of *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) on sheep in northeastern Spain in relation to midge capture using UV light and carbon dioxide-baited traps. *Journal of Medical Entomology* 46: 615-624.
- Kettle, D. S. 1969a.** The biting habits of *Culicoides furens* (Poey) and *C. barbosai* Wirth & Blanton. I. The 24-h cycle, with a note on differences between collectors. *Bull ent Res* 59: 21-31.
- Kettle, D. S. 1969b.** The biting habits of *Culicoides furens* (Poey) and *C. barbosai* Wirth & Blanton. II. Effects of meteorological conditions. *Bull ent Res* 59: 241-258.
- Kettle, D. S., P. B. Edwards, and A. Barnes. 1998.** Factors affecting numbers of *Culicoides* in truck traps in coastal Queensland. *Medical and Veterinary Entomology* 12: 367-377.
- Lillie, T. H., D. L. Kline, and D. W. Hall. 1987.** Diel and seasonal activity of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) Near Yankeetown, Florida, Monitored with a vehicle-mounted insect trap. *Journal of Medical Entomology* 24: 503-511.
- Meiswinkel, R., M. Baylis, and K. Labuschagne. 2000.** Stabling and the protection of horses from *Culicoides bolitinos* (Diptera : Ceratopogonidae), a recently identified vector of African horse sickness. *Bulletin of Entomological Research* 90: 509-515.
- Meiswinkel, R., M. Goffredo, E. G. M. Dijkstra, I. J. K. van der Ven, T. Baldet, and A. Elbers. 2008.** Endophily in *Culicoides* associated with BTV-infected cattle in the province of Limburg, South-Eastern Netherlands, 2006. *Preventive Veterinary Medicine* 87: 182-195.
- Mellor, P. S., J. Boorman, and M. Baylis. 2000.** *Culicoides* biting midges: Their role as arbovirus vectors. *Annual Review of Entomology* 45: 307-340.
- Murray, M. D. 1987.** Local dispersal of the biting midge *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) in south-eastern Australia. *Australian Journal of Zoology* 35: 559-573.

- Ninio, C., D. Augot, B. Dufour, and J. Depaquit. 2011.** Emergence of *Culicoides obsoletus* from indoor and outdoor breeding sites. *Vet Parasitol* [Epub ahead of print].
- Nolan, D. V., S. Carpenter, J. Barber, P. S. Mellor, J. F. Dallas, A. J. Mordue, and S. B. Piertney. 2007.** Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Microbiology* 124: 82-94.
- Overgaard Nielsen, B., and O. Christensen. 1975.** A mass attack by biting midge *Culicoides nubeculosus* (Mg.) (Diptera, Ceratopogonidae) on grazing cattle in Denmark a new aspect of sewage discharge. *Nordisk Veterinaermedicin* 27: 365-372.
- R Development Core Team. 2008.** An Introduction to R: Notes on R, A Programming Environment for Data Analysis and Graphics. In R. F. f. S. Computing [ed.], Vienna, Austria.
- Solano, P., G. Duvallet, V. Dumas, D. Cuisance, and G. Cuny. 1997.** Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). *Acta Tropica* 65: 175-180.
- Tauber, C. A., and M. J. Tauber. 1981.** Insect seasonal cycles: genetics and evolution. *Annual Review of Ecology and Sytematics* 12: 281-308.
- Tsutsui, T., Y. Hayama, M. Yamakawa, H. Shirafuji, and T. Yanase. 2010.** Flight behavior of adult *Culicoides oxystoma* and *Culicoides maculatus* under different temperatures in the laboratory. *Parasitol Res* 108: 1575-8.
- van der Rijt, R., R. van den Boom, Y. Jongema, and M. M. van Oldruitenborgh-Oosterbaan. 2008.** *Culicoides* species attracted to horses with and without insect hypersensitivity. *The Veterinary Journal* 178: 91-7.
- Velthuis, A. G. J., H. W. Saatkamp, and M. C. M. Mourits. 2009.** Financial consequences of the dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 & 2007. *Preventive Veterinary Medicine*: 11.
- Viennet, E., C. Garros, L. Gardes, I. Rakotoarivony, X. Allene, R. Lancelot, D. Crochet, C. Moulia, T. Baldet, and T. Balenghien. submitted.** Host preferences of Palaearctic *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): implications for Orbivirus transmission. *Medical and veterinary entomology*.
- Viennet, E., C. Garros, R. Lancelot, X. Allene, L. Gardes, I. Rakotoarivony, D. Crochet, J.-C. Delecolle, C. Moulia, T. Baldet, and T. Balenghien. 2011.** Assessment of vector/host contact: comparison of animal-baited traps and UV-light/suction trap for collecting *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of Orbiviruses. *Parasites & Vectors* 4: 119.
- Votypka, J., P. Synek, and M. Svobodova. 2009.** Endophagy of biting midges attacking cavity-nesting birds. *Medical and Veterinary Entomology* 23: 277-280.

Wilson, A. J., and P. S. Mellor. 2009. Bluetongue in Europe: past, present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 364: 2669-2681.

Zimmer, J.-Y., C. Saegerman, B. Losson, and E. Haubruge. 2010. Breeding sites of bluetongue virus vectors, Belgium [letter]. *Emerg Infect Dis* 16: 575-576.

Figure captions

Figure 1: Sketch map of the study site at Nouzilly (western France) with the location of the sheep-baited traps (drop trap and suction trap) in the three sites (field, large-open-stable, closed stable) and of the UV-light/suction trap.

Figure 2: Climatic conditions in the study site: A. Ombrothermic diagram for comparison between 2010 and the 1971-2000 period (data from Météo-France station of Parçay-Meslay); B. Boxplots of temperature (°C) and relative humidity (%) recorded by data loggers at each location during the 15 collection sessions; C. Boxplots of mean and maximum wind speed (km/h) recorded by the local weather station during each of the 6 summer collections.

Figure 3: Abundance of *Culicoides obsoletus* according to the trap and the location in spring (A), summer (B) and autumn (C). LOS: largely open stable.

Figure 4: Circadian host-seeking activity of *C. brunnicans* and *C. obsoletus*: Total number of females collected outdoor by host-baited traps at each session and day time. Small symbols are single collection and lines with large symbols the means by period. Vertical lines symbolize the time of sunrise and sunset.

Figure 5: Number of *Culicoides* collected outdoor in host-baited traps compared to meteorological parameters recorded by MétéoFrance weather stations located at Parçay-Meslay or at Saunay. Lines are the distribution histogram of meteorological parameters recorded during the collections.

Figure 6: Correlation between the numbers of *C. brunnicans* and *C. obsoletus* collected outdoor in host-baited traps and in UV-light/suction trap.

Discussion du Chapitre 4

En capturant des *Culicoides* sur des bovins à l'intérieur de bâtiments au Danemark, Overgaard Nielsen & Christensen (1975) ont mis en évidence un certain degré d'endophagie chez les espèces paléarctiques. Pendant 30 ans, aucune étude, à notre connaissance, ne s'intéressera à cet aspect du comportement trophique. Récemment, Meiswinkel *et al.* (2008) ont comparé le résultat de captures à l'intérieur et à l'extérieur de bâtiments en utilisant des pièges à lumière ultra-violette. Trois fois plus de *Culicoides* ont été capturés à l'extérieur qu'à l'intérieur, sauf en cas de ciel couvert, où cette tendance semble s'inverser. Ces auteurs pensent que certaines espèces de *Culicoides* pourraient attaquer les bovins en pâture et les suivre lorsqu'ils rentrent dans les bâtiments, mais aucune preuve formelle n'est apportée. Les espèces collectées à l'intérieur des bâtiments, *i.e.* *C. obsoletus/scoticus*, *C. dewulfi* et *C. chiopterus* sont celles potentiellement impliquées dans la transmission du sérotype 8 du virus de la FCO (Meiswinkel *et al.*, 2008). En France et dans la même période de l'année, Baldet *et al.* (2008) ont collecté les mêmes espèces en plus grande proportion à l'intérieur de bâtiments d'élevage qu'à l'extérieur, en utilisant la même méthode de piégeage. Cependant ces résultats sont difficiles à interpréter dans la mesure où le degré d'ouverture des bâtiments d'élevage, et la présence et l'abondance des animaux autour des pièges lumineux étaient variables (Baldet *et al.*, 2008). Par une comparaison rigoureuse (carré latin avec comme facteurs intérieur/extérieur et présence/absence d'animaux), Baylis *et al.*, (2010) ont montré que la présence d'animaux ainsi que l'ouverture des bâtiments augmentaient le nombre de *Culicoides* collectés à l'intérieur d'un bâtiment, le ratio extérieur *versus* intérieur est de 6,5 en été et de 3 en automne. Néanmoins, toutes ces récentes études ont été réalisées avec des pièges lumineux, ce qui complique l'interprétation des résultats⁸. Nous avons donc utilisé des pièges à appât et observé que les *Culicoides* présents sur le site sont exclusivement, *C. brunnicans*, ou principalement, *C. obsoletus*, *C. scoticus* et *C. dewulfi*, exophages. Le degré avec lequel *C. obsoletus* pénètre dans les bâtiments semble dépendre de la saison, avec des interactions parfois difficiles à interpréter. Il est probable que l'accessibilité des hôtes puisse être un facteur déterminant dans le degré d'endophagie des *Culicoides*. Les élevages suivent des rythmes de production régulés par les saisons en fonction des conditions pédoclimatiques, de la qualité du système fourrager et d'autres contraintes (agnelage de printemps, mise en pâture et rotations...). Le site expérimental, sur lequel se sont déroulées les captures, présentait des troupeaux en bergerie, mais aussi à la pâture, pendant la première et deuxième session de capture, mais pas pendant la troisième. Ce facteur, que nous ne pouvions pas contrôler, a pu avoir un effet sur le degré d'endophagie des espèces à l'automne, mais, néanmoins, un faible ratio entre captures intérieures et extérieures a été trouvé aussi au printemps. Les différences de conditions météorologiques, en particulier les gradients de température, humidité et lumière, entre intérieur et extérieur pourraient avoir une influence sur le degré d'endophagie des *Culicoides*.

Les conditions météorologiques ont une influence sur l'activité des *Culicoides*, la luminosité semblant être un paramètre essentiel, pouvant perturber la dynamique circadienne

⁸ Des détails seront donnés dans la discussion générale

régulée par le rythme endogène. *C. brunnicans* présente deux pics d'activité : un juste après le lever et l'autre autour du coucher de soleil. Les autres espèces, *C. obsoletus*, *C. scoticus* et *C. dewulfi* sont actifs autour du coucher de soleil, et secondairement après le lever du soleil. Il est intéressant de noter que l'activité circadienne varie avec la saison, avec une activité principalement avant le coucher du soleil au printemps et à l'automne et après le coucher du soleil en été. D'un point de vue évolutif, cette tendance pourrait être perçue comme un moyen d'éviter les faibles températures en saison fraîche et éviter la dessiccation par fortes températures. Certaines espèces semblent donc adapter leur activité de recherche d'hôte en fonction des conditions environnementales. Cette observation montre la difficulté de séparer la régulation par le rythme endogène, qui est synchronisé sur les saisons, de l'influence des paramètres météorologiques qui modifient l'activité de vol. En termes de lutte vectorielle, il apparaît difficile de proposer une stratégie claire.

Discussion générale

Discussion générale

L'objectif de cette thèse était de participer à l'amélioration des connaissances sur la biologie et l'écologie des espèces paléarctiques de *Culicoides* en caractérisant le comportement trophique des espèces d'intérêt vétérinaire par des approches standardisées et pour certaines nouvelles. Ce travail a été structuré en plusieurs grandes questions.

Que sait-on sur la biologie et l'écologie des Culicoides adultes?

La revue de la littérature portant sur la biologie et de l'écologie des adultes *Culicoides* a permis de constater que, malgré l'intérêt suscité par ces petits moucheron en tant que nuisibles et vecteurs de par le monde, et en particulier depuis l'émergence de la FCO en Europe, encore beaucoup de points restent à élucider. Certes de nombreuses études ont été entreprises, notamment ces dernières années, mais les méthodes employées ne sont pas toujours adaptées et rarement standardisées, ce qui aboutit à des observations dont l'interprétation est limitée à un contexte particulier (expérimental, local) et difficilement généralisables voire même simplement extrapolables.

Quels pièges pour quels objectifs d'étude ?

Nous avons décidé de nous focaliser exclusivement sur le contact entre les *Culicoides* et leurs hôtes, composante du comportement des *Culicoides* qui est déterminante pour la compréhension de la transmission d'Orbivirus. Le risque de transmission du virus est dépendant de plusieurs facteurs dont le taux de piqure, les préférences trophiques et le taux de parité, qui est un indicateur grossier du taux de survie de la population (Macdonald, 1950; Garrett-Jones and Shidrawi, 1969; Service, 1977). Un moyen d'étudier le comportement trophique, et en particulier de déterminer le taux de piqure qui est un paramètre essentiel des modèles épidémiologiques, est de collecter les femelles directement sur un hôte appât (Garrett-Jones, 1964; Silver and Service, 2008). Mais cette collecte directement sur animaux, réalisée classiquement chez les *Culicoides* à partir de deux méthodes, *i.e.* le *drop trap* et l'aspiration directe, est relativement difficile à réaliser et lourde techniquement. Comme pour toutes les études en conditions naturelles, les résultats des collectes vont dépendre des conditions climatiques (température, humidité, intensité lumineuse et vitesse du vent), de la disponibilité et de l'accessibilité aux hôtes (Murray, 1987; Barnard, 1997; Baylis *et al.*, 2010; Garcia-Saenz *et al.*, 2011). La méthode de collecte la plus simple à mettre en œuvre, *i.e.* le piège à lumière ultraviolette, est très largement utilisée pour échantillonner les populations de *Culicoides* et les résultats sont souvent la base de l'incrimination des espèces en tant que vecteur potentiel. Toutefois, les données d'abondance et de diversité obtenues avec ce piège concernent essentiellement des espèces ayant une activité crépusculaire ou nocturne, c'est-à-dire par définition lorsque le piège est actif, et ne reflètent pas fidèlement les préférences pour les hôtes d'intérêt.

Afin d'utiliser la méthode la plus appropriée pour l'étude du contact hôte/*Culicoides*, il nous a paru indispensable de comparer les différentes méthodes disponibles et les plus utilisées. Puisque les pièges à appât (*drop trap* et aspiration directe) sont assez contraignants et nécessitent une intervention humaine fréquente, et dans la mesure où le piège le plus

communément utilisé, le piège à lumière ultraviolette, ne représente pas correctement le taux de piqûre, le défi a été de concevoir, tester et valider une nouvelle méthode de capture sur appât qui ne nécessiterait pas autant de manipulation autour de l'animal. Le principe est de recouvrir l'animal d'une couverture collante, ce qui permet de collecter les individus venant se poser sur l'animal sans en changer l'aspect visuel, la difficulté étant de minimiser le pouvoir attractif ou répulsif du dispositif. Cette méthode a été comparée avec les autres pièges à appât et avec le piège lumineux, en réalisant des collectes autour du coucher de soleil et à partir d'un protocole standardisé en carré latin, ce qui a permis de confirmer et d'observer plusieurs tendances. Les biais de chacune des méthodes de capture ont été évalués en fonction de leur capacité à collecter des femelles en recherche d'hôte. La principale difficulté était l'absence d'une méthode de référence, toutes ayant un dispositif expérimental pouvant attirer ou repousser les *Culicoides*. Certaines données objectives (capture de mâles ou de femelles gorgées) ont pu être utilisées pour évaluer les biais des méthodes de capture, qui ont été surtout comparées relativement les unes par rapport aux autres.

L'aspiration directe a été la seule méthode qui n'a pas collecté de mâle ni de femelles gravides. Cependant, selon les espèces, cette méthode a capturé autant ou moins de femelles que les autres méthodes, suggérant que la présence humaine (pendant les aspirations répétées de 10 minutes) a pu déranger l'activité des femelles. Même si le degré de cet effet est mal connu, l'aspiration directe semble collecter essentiellement des femelles en recherche d'hôte et peut donc être utilisé pour estimer le taux de piqûre des *Culicoides*.

Le *drop trap* a été la méthode de capture sur hôte qui a capturé le plus grand nombre de femelles (sauf pour *C. scoticus*, en plus grande quantité sur la couverture collante). On peut s'attendre à ce que la structure et la masse blanche du *drop trap*, certainement sélectionné comme objet-marqueur par les *Culicoides*, a pu orienter et attirer les *Culicoides*. Ce qui expliquerait pourquoi le *drop trap* a tendance à capturer quelques mâles et pourrait ne pas capturer uniquement des femelles en recherche d'hôte (e.g. un nombre plus important de femelles *C. obsoletus* pares, gorgées a été capturé dans ce piège comparativement aux autres pièges) et donc à surestimer le taux de piqûre. L'avantage de ce piège est de laisser la possibilité aux femelles de se gorger, à la différence de l'aspiration directe et du piège collant, phase du comportement trophique qui peut être décisive chez certaines espèces de *Culicoides*. Il est intéressant de noter que *C. dewulfi*, la deuxième espèce la plus abondante collectée dans le *drop trap*, n'a jamais été trouvée gorgée sur mouton. Il est possible que les femelles de *C. dewulfi* aient été attirées par les moutons alors qu'elles ne se gorgent pas sur cet hôte. Une telle spécificité d'hôte a été suggérée pour *C. chiopterus* (Garros *et al.*, 2011). Lorsque des captures ont été réalisées avec des *drop traps* et des pièges à aspiration fonctionnant en parallèle, les abondances estimées étaient différentes entre les deux pièges. En outre, la présence de femelles gravides dans le piège à aspiration laisse penser que ce piège ne capture pas uniquement des femelles en recherche de repas de sang. Néanmoins, ces différences entre pièges peuvent refléter les variations spatiales entre populations. La corrélation entre abondances capturées par le *drop trap* et par le piège à aspiration est parfaite pour *C. brunnicans* et très satisfaisante pour *C. obsoletus* suggérant que le piège à aspiration peut être perçu comme une méthode alternative au *drop trap* efficace et facile à utiliser.

La couverture collante a montré sa capacité à prédire correctement le taux de piqûre des espèces abondantes. Cependant, la collecte de femelles gravides et gorgées indiquent que le piège collant peut agir, dans une certaine mesure, en tant que piège à interception. Lors de la comparaison des pièges, les espèces telles que *C. obsoletus* et *C. dewulfi*, collectées dans les autres pièges n'étaient pas (ou quasiment pas) collectées sur ce piège collant. Les raisons précises de cette non capture ne sont pas connues, mais peuvent être liées soit à un mauvais patron de la couverture qui ne recouvrait pas correctement la tête et les oreilles – la partie recouvrant la tête est délicate à mettre en place, puisque l'animal doit pouvoir correctement manger et respirer et voir – soit à une sensibilité de ces espèces à la substance collante, pourtant réputée inodore et non volatile. On peut aussi imaginer que la couverture associée à la substance collante empêchait au moins en partie l'émanation des odeurs de l'animal, ce qui aurait pu limiter son attractivité pour certaines femelles *Culicoides*. Nous avons testé comme substance collante l'huile d'œillet, l'huile de ricin, la colle d'os, la vaseline lavable et en gel. La vaseline en gel a été sélectionnée, car elle est facile à appliquer et sans odeur. L'huile de ricin couramment utilisée pour la capture de phlébotomes a été testée puis écartée pour ses propriétés trop liquides. La vaseline en gel, en revanche présente une structure plus compacte et conserve ses propriétés collantes en application épaisse plusieurs heures après application. La difficulté de dilution de ce gel limite, cependant, la possibilité d'utiliser ce piège de manière tout à fait satisfaisante.

Au cours de nos différentes sessions de capture, nous avons montré que le piège à lumière ultraviolette sous-estime le taux de piqûre de *C. brunnicans* et *C. scoticus* et confirmé qu'il semble surestimer celui de *C. obsoletus* (Carpenter *et al.*, 2008). Nous nous sommes efforcés de toujours effectuer des captures avec un piège lumineux en parallèle de nos captures sur appât de manière à obtenir des relations entre le taux de piqûre sur animal et l'abondance dans les pièges, même si le dispositif expérimental ne permettait pas toujours une comparaison rigoureuse (parfois absence d'animaux dans l'environnement immédiat du piège). Le piège lumineux capture des quantités importantes de *Culicoides* et est facile d'utilisation pour inventorier les espèces présentes sur la zone d'expérimentation, mais ne collecte pas seulement les espèces en recherche d'hôte, puisque des mâles et femelles gravides sont également piégés. Ce piège ne devrait pas être utilisé directement pour estimer le taux de piqûre. Cette discordance limite la prédiction du risque d'apparition du virus de la fièvre catarrhale ovine sachant que les programmes de surveillance utilisent ce piège lumineux depuis 2000 au sud de l'Europe, et depuis 2006 dans le nord et le centre de l'Europe (Calistri *et al.*, 2003; Conte *et al.*, 2007; Baldet *et al.*, 2008; Meiswinkel *et al.*, 2008). Pour la première fois en Europe, ce travail a permis de comparer les aptitudes de différents pièges à appât à collecter des femelles en recherche d'hôte. Chaque piège présente des biais différents, ce qui permet d'orienter leur utilisation en fonction des objectifs scientifiques (surveillance, lutte, protection de cheptel d'intérêt vétérinaire).

Quelles sont les préférences trophiques des espèces d'intérêt vétérinaire ?

La probabilité de réussite d'un repas sanguin dépend de l'attractivité propre de l'hôte (réponse positive de l'insecte aux *stimuli* qui émanent de l'hôte) et de son acceptabilité

(réussite du gorgement sur l'hôte qui dépend souvent de l'intensité des mouvements de défense) (Boreham and Garrett-Jones, 1973; Clements, 1999; Lardeux *et al.*, 2007). Les facteurs d'attraction peuvent être le dégagement de CO₂, l'humidité de la respiration, la chaleur corporelle, le panache d'odeur des hôtes. En Amérique du Nord, les individus du Complexe Variipennis semblent être attirés par le CO₂ (Nelson, 1965; Mullens, 1995). Cependant, en Espagne très peu de *C. obsoletus* et *C. parroti* ont été collectés par un piège à aspiration appâté avec du CO₂ mais en compétition directe avec un hôte (Mullens *et al.*, 2005; Gerry *et al.*, 2009). Les facteurs visuels comme la couleur et la forme de l'hôte, qui sont important pour l'orientation dans la phase finale d'approche, influencent également l'attractivité. L'influence relative de ces facteurs n'est pas totalement comprise. Humphreys et Turner (1973) n'ont pas trouvé d'influence de la couleur des hôtes dans l'attraction des *Culicoides*. La taille de l'hôte, corrélée avec le volume des émanations de CO₂ et des autres odeurs, influence l'attraction des *Culicoides* (Humphreys and Turner, 1973; Tanner and Turner, 1974; Raich *et al.*, 1997).

Nous avons étudié les préférences trophiques des espèces paléarctiques de *Culicoides* d'intérêt vétérinaire à deux échelles : une première étude de capture directe sur animal appât dans un élevage de l'ouest de la France et la deuxième étude cherchant à identifier l'origine des repas de sang de femelles gorgées capturées dans 5 élevages français. Dans le premier cas, afin de pallier les contraintes du *drop trap* et de l'aspiration directe (présence humaine, contrainte de temps), nous avons utilisé des couvertures collantes pour quantifier le nombre de *Culicoides* attirés par un cheval (cible du virus de la peste équine), différents ruminants (cibles du virus de la fièvre catarrhale ovine et de la maladie épizootique hémorragique) et des poules (permettant de différencier les espèces mammophiles et ornithophiles). Même si la couverture collante peut jouer le rôle d'un piège à interception, nous avons collecté la majorité des femelles de *Culex pipiens* (espèce ornithophile) (Vinogradova, 2000) sur la cage des poules et des *Stomoxys calcitrans* sur cheval, génisse et poule, ce qui est cohérent avec la littérature et donc suggère que la couverture collante est une méthode fiable pour étudier les préférences trophiques (Warnes and Finlayson, 1987 ; Johnson *et al.*, 2010). Les espèces de *Culicoides* sont principalement collectées sur le cheval, confirmant les tendances mammophiles de *C. scoticus*, *C. obsoletus* et *C. dewulfi* (Carpenter *et al.*, 2008). D'autre part, nous avons montré que *C. obsoletus* décrit comme attaquant les chevaux, moutons et bovins (Overgaard Nielsen, 1971; Townley *et al.*, 1984; Mullens *et al.*, 2005; Carpenter *et al.*, 2008; Gerry *et al.*, 2009) est également attiré par les poules, ce qui montre son caractère opportuniste. Afin de faire la distinction entre l'effet de la taille de l'hôte et la préférence trophique en elle-même, les données d'abondance ont été standardisées par le poids, la surface corporelle et le facteur d'allométrie de Kleiber. Le cheval, hôte le plus attractif quelle que soit la standardisation utilisée, rend difficile l'interprétation des préférences pour les autres animaux. On peut suggérer les hypothèses suivantes : soit le cheval est effectivement l'hôte préféré, ou soit par sa corpulence, le cheval efface l'effet des autres animaux présents, illustrant un effet seuil, c'est-à-dire pas de relation linéaire entre l'effet taille de l'hôte et le nombre de *Culicoides* attirés. Les femelles ont pu être gênées par le comportement de la génisse et de la chèvre et dans une moindre mesure du mouton qui avaient tendance à se coucher.

Les sites préférentiels d'attaque des espèces de *Culicoides* d'intérêt vétérinaire peuvent varier en fonction de l'hôte, de l'épaisseur de la laine ou du poil, de la couleur voire même de la température des différentes parties du corps (Braverman, 1988). Nielsen (1971) a montré que *C. obsoletus* attaquait surtout au niveau du ventre alors que *C. chiopterus* attaque plutôt au niveau des membres. Townley *et al.* (1984) montrent que *C. obsoletus* et *C. dewulfi* atterrissent sur cheval et se gorgent principalement au niveau de la crinière et secondairement sur les membres. Lors de la comparaison de piège et de l'étude des préférences trophiques, nous avons étudié les différentes zones d'attaque des *Culicoides*. A l'issue de la comparaison de pièges, nous avons constaté que *C. brunnicans* semble ne pas avoir de zone d'attaque privilégiée, alors que *C. obsoletus* préférerait attaquer sur les parties basses et *C. dewulfi* plutôt sur les parties hautes. Cependant, lors de l'étude des préférences trophiques, nous n'avons pas identifié de site préférentiel sur le cheval pour *C. obsoletus*, alors que *C. dewulfi* était confirmé sur les parties hautes, tout comme *C. scoticus*. Les sites de piqûres peuvent changer en fonction de la diversité spécifique présente. Des interactions entre espèces pourraient faire varier la sélection d'une zone de pique en minimisant les compétitions pour l'accès à la ressource alimentaire.

Après s'être posées, les femelles hématophages ne se gorgent pas forcément. La « décision » dépend certainement de l'intensité des mouvements de défense et également de l'appréciation de la zone à piquer. Si par exemple, *C. arboricola* est autant attiré par le lapin que par la dinde, le taux de gorgement est plus élevé sur l'oiseau que sur le mammifère (Tanner and Turner, 1974). Aussi, *C. chiopterus* a été collecté abondamment sur mouton (Carpenter *et al.*, 2008). Cependant, cette même espèce a été collectée plusieurs fois dans des fermes ovines mais gorgée sur bovins (Garros *et al.*, 2011). Le taux de gorgement de *C. obsoletus* collectés par le *drop trap* était relativement élevé sur mouton alors que *C. dewulfi*, certes en plus faible abondance, n'a jamais été trouvé gorgé (Viennot *et al.*, 2011). Dans ce cas, *C. dewulfi* a pu être attiré par la structure du piège ou par les moutons, sans qu'il ne puisse se gorger sur cet hôte.

En l'absence d'informations plus complètes, nous avons considéré un taux de gorgement maximal pour calculer la probabilité qu'à *C. obsoletus* de se gorger deux fois sur une même espèce d'hôte ou successivement sur deux espèces différentes au sein d'un troupeau mélangeant moutons et vaches ou vaches et chevaux. Cette probabilité peut permettre d'estimer la capacité qu'a une espèce de transmettre un pathogène au sein de population d'hôtes de même espèce ou au sein de population d'hôtes d'espèces différentes (Balenghien *et al.*, 2011). Il semblerait que dans des troupeaux mélangeant bovins et ovins, le virus de la fièvre catarrhale ovine soit transmis facilement entre ces deux espèces. De plus, l'effet leurre que peut avoir un cheval ou un âne au sein d'un troupeau de bovins peut vite être compensé par l'effet masse du troupeau de bovins. Ainsi, cet exemple théorique illustre la nécessité de quantifier les préférences trophiques et pointe du doigt la relativité de l'ajout d'animal-leurre pour prévenir de la transmission du virus de la fièvre catarrhale ovine.

L'autre méthode permettant d'étudier la préférence trophique est indirecte. Un outil moléculaire d'identification de l'origine des repas de sang à partir d'une méthode multiplexée

espèce-spécifique a été développé et validé permettant d'analyser l'origine du repas de sang de femelles gorgées capturées sur cinq sites en France.

Cette étude à large échelle a permis de pallier la complexité des expérimentations avec pièges à appât sur une échelle nationale et a pu permettre d'analyser le comportement trophique des espèces de *Culicoides* d'intérêt vétérinaire. Les femelles collectées se sont gorgées sur les animaux les plus proches, sauf *C. chiopterus* : La majorité des femelles gorgées au sein d'élevages ovins étaient gorgées sur bovins, illustrant sa relative spécificité et la capacité de ses femelles gorgées à se déplacer sur plusieurs centaines de mètres. Cette étude a montré la nécessité d'identifier et d'étudier les préférences trophiques des *Culicoides* à l'espèce et non seulement au groupe.

Suite à ces recherches sur les préférences trophiques, plusieurs questions émergent :

Les préférences trophiques évoluent-elles au cours du temps ? Qu'elle est la plasticité écologique des espèces d'intérêts ?

Si une espèce de *Culicoides* se gorge préférentiellement sur une espèce d'hôte, que se passe-t-il lorsque cette espèce disparaît ? Est-ce que les préférences de cette espèce de *Culicoides* peuvent évoluer vers une autre espèce d'hôte ou devient-elle moins sélective, c'est-à-dire opportuniste ?

Est-ce que certaines espèces présentent des comportements strictement endo ou exophagie ? Ce comportement varie-t-il au cours des saisons ? A quel moment de la journée les espèces d'intérêt vétérinaire partent-elles à la recherche d'hôtes ?

Jusqu'à aujourd'hui, les études récentes portant sur l'endo/exophagie des *Culicoides* se sont toujours déroulées avec des pièges à lumière ultraviolette (Anderson *et al.*, 1993; Barnard, 1997; Meiswinkel *et al.*, 2000; Baldet *et al.*, 2008; Meiswinkel *et al.*, 2008; Calvete *et al.*, 2009; Baylis *et al.*, 2010), hormis l'étude de Votypka *et al.* (2009) qui ont étudié l'endophagie des espèces ornitophiles en utilisant un nichoir artificiel dont l'intérieur était recouvert de feuilles plastiques collantes (utilisées contre les agresseurs de fruitier). En outre, les *Culicoides* sont principalement décrits comme crépusculaires (Mellor *et al.*, 2000), mais très peu de travaux ont rigoureusement entrepris l'étude du rythme circadien sur 24 heures consécutives (Kettle, 1969; Barnard and Jones, 1980; Lillie *et al.*, 1987). D'autre part, une seule étude a étudié le rythme circadien du comportement de recherche d'hôte des espèces européennes de *Culicoides* en réalisant des piégeages sur cheval pendant 24 heures (van der Rijt *et al.*, 2008).

Pour combler ce manque, nous avons décidé d'utiliser des pièges à aspiration et, en parallèle, des *drop traps* pour étudier l'endo/exophagie et le rythme circadien des espèces paléarctiques de *Culicoides*. L'utilisation d'une couverture collante ne nous paraissait pas la plus adéquate dans la mesure où les pièges étaient récoltés régulièrement (pour étudier le rythme circadien) ce qui aurait généré un nombre considérable de couvertures impossibles à analyser au fur et à mesure. Nous avons supposé que le faible nombre de *Culicoides* capturés lors de notre comparaison de piège était lié à la compétition entre l'animal servant d'appât et les autres animaux environnants. Ainsi, nous avons jugé plus judicieux d'appâter les pièges

avec un nombre plus important de moutons, en l'occurrence 4 par site, afin de maximiser les collectes. Un piège à aspiration de grande taille a été conçu par notre équipe de manière à aspirer les *Culicoides* attirés par les moutons appâts et cela sans (ou avec très peu) d'intervention humaine. Un système rotatif permettant de changer automatiquement les bouteilles de collecte a été adapté au système aspirant. N'ayant pas eu l'occasion de comparer ce piège aux autres pièges à appât lors de la première année d'expérimentations, nous avons utilisé des *drop traps* en parallèle de ce « nouveau » piège.

Nous avons réalisé des collectes à l'intérieur et à l'extérieur de bâtiments (avec deux degrés d'ouverture). Au cours de notre travail, nous avons démontré que la majorité des espèces paléarctiques de *Culicoides* sont principalement exophages, certaines espèces, comme *C. brunnicans*, pouvant être strictement exophages. D'autres espèces comme *C. obsoletus* et *C. scoticus* sont capables également de rentrer dans les bâtiments pour se nourrir. Par ailleurs, nous avons montré que *C. brunnicans* présente deux pics d'activité : l'un après le lever et l'autre autour du coucher du soleil. Blackwell *et al.* (1997) avaient observé une activité de vol bimodal sur les mêmes tranches horaires pour *C. impunctatus*. Les autres espèces d'intérêt vétérinaire *C. obsoletus*, *C. scoticus*, *C. dewulfi* et *C. chiopterus* ont, quant à elles, une activité principale autour du coucher du soleil, quelques individus ayant été cependant collectés autour du lever du soleil. Il est probable que dans des contextes de plus fortes abondances un second pic d'activité, sans doute secondaire, aurait été mis en évidence autour du lever de soleil comme l'avait mis en évidence Van der Rijt *et al.* (2008) pour *C. obsoletus*.

Dans la littérature, il est reporté que la différence d'abondance à l'extérieur et à l'intérieur des bâtiments est moindre à l'automne que pendant l'été (Baylis *et al.*, 2010). Baylis *et al.*, (2010) suggèrent que les vents forts, souvent plus fréquents à l'automne, peuvent également perturber l'activité de vol des *Culicoides* à l'extérieur, mais aussi diminuer l'efficacité de capture du piège lumineux. De plus, les piégeages lumineux peuvent sous-estimer un pic d'activité des *Culicoides* qui pourrait avoir lieu plus tôt dans la journée à cause des basses températures automnales, phénomène déjà observé pour les *Culicoides* (Murray, 1987; Kettle *et al.*, 1998). Ce phénomène pourrait être d'autant plus fort à l'extérieur, que la température y diminue plus vite qu'à l'intérieur. Notre étude a permis de confirmer cette tendance, montrant, pour *C. obsoletus*, une différence d'abondance extérieure/intérieure plus faible en automne et au printemps qu'en été, et ce sans les problèmes d'interprétation liés aux pièges lumineux. Il est possible qu'au printemps ou à l'automne, les différences de conditions physiques soient moindres entre intérieur et extérieur, facilitant l'entrée des *Culicoides*. Ainsi, la différence de luminosité est moindre, et il a été montré que par temps couvert, les captures des pièges à lumière ultraviolette installés à l'intérieur augmentent (Meiswinkel *et al.*, 2000; Meiswinkel *et al.*, 2008). Par ailleurs, le nombre de moutons pâturent autour des sites de capture était plus faible à l'automne que pendant les autres périodes. Ainsi, la disponibilité en hôte diminuant à l'extérieur, l'attractivité relative des animaux à l'intérieur augmenterait.

La présence de quelques femelles *C. obsoletus* gravides à l'intérieur du bâtiment indique que certaines femelles peuvent rentrer pour pondre, ce qui concorde avec des observations de la présence de larves à l'intérieur de bâtiments dans le fumier de bovin (Zimmer *et al.*, 2010; Ninio *et al.*, 2011).

C. brunnicans, une espèce à surveiller de près ?

Culicoides brunnicans est une espèce peu étudiée. Nous avons montré que cette espèce pouvait être particulièrement abondante localement attaquant les moutons. D'après les descriptions disponibles sur son écologie, *C. brunnicans* serait rencontré dans les plaines et pâtures en association avec des zones humides (sans beaucoup de précision sur les caractéristiques de ces zones) et serait largement distribuée dans l'ouest de la région paléarctique. En se basant sur les données de la surveillance entomologique nationale en France, cette espèce a été collectée dans 73 des 160 sites de capture. Son abondance est en général relativement basse (plus de 1 % des captures seulement dans 23 sites), mais peut atteindre sur certains sites 10 à 13 % des captures. La compétence vectorielle des *Culicoides* paléarctiques est encore assez peu documentée et on ne sait pas dans quelle mesure elle intervient comme un facteur limitant dans la transmission. Les taux d'infection sont en général très faibles, et pourraient être compensés par l'abondance de ces insectes. Ainsi, il conviendrait d'évaluer la compétence vectorielle de cette espèce pour inférer sur son potentiel rôle vecteur dans les zones où elle est abondante.

De multiples facteurs de variabilité d'activité

Il est bien documenté que le spectre d'hôtes sur lequel se gorgent des insectes hématophages peut varier en fonction des saisons (Chandler *et al.*, 1977; Kilpatrick *et al.*, 2006). Par exemple, en Amérique du Nord, *Culex nigripalpus* Theobald et *Culex tarsalis* Coquillett, vecteurs du virus de l'encéphalite de Saint Louis, se gorgent préférentiellement sur oiseau tout au long de l'année, sauf pendant l'été, où les mammifères sont les plus piqués (Edman and Taylor, 1968; Edman, 1974). De même, *Cx. pipiens*, dans l'ouest des Etats-Unis d'Amérique, se gorge préférentiellement sur le merle d'Amérique (*Turdus migratorius*), sauf à l'automne où les repas sur homme deviennent très fréquents (Kilpatrick *et al.*, 2006). Plusieurs hypothèses existent pour expliquer ce changement de choix d'hôte au cours de la saison, l'une est la diminution ou disparition des hôtes appropriés. Ainsi, Kilpatrick *et al.* (2006) soupçonne que la migration des merles d'Amérique entraînerait un déplacement des repas de *Cx pipiens* des oiseaux vers les hommes. Le même type de phénomène pourrait exister chez les *Culicoides*. En effet, il est souvent suggéré que les *Culicoides* préféreraient piquer les bovins, et ne s'attaqueraient aux ovins que tard dans les saisons, lorsque les cas cliniques apparaissent. Aucune preuve formelle n'a cependant jamais été mise en évidence. De futures études analysant l'origine des repas de sang de femelles au cours de l'année permettra de tester cette hypothèse.

L'abondance estimée par piégeage lumineux dépend beaucoup des conditions locales (présence et nombre d'animaux aux alentours du piège). *Culicoides imicola* est décrit classiquement comme étant une espèce exophage (Barnard, 1997; Meiswinkel *et al.*, 2000). Néanmoins la récente publication de Calvete *et al.*, (2009) a montré qu'en Espagne, *C. imicola* peut également être retrouvé à l'intérieur des bâtiments. Plusieurs explications possibles sont proposées : *C. imicola* peut avoir tendance à entrer dans les bâtiments à la fin de la saison, lorsque les températures extérieures diminuent (cf. supra). Des variations de comportement d'endo/exophagie peuvent exister entre différentes populations d'une même

espèce. En outre, la notion de bâtiments d'élevage et de leur degré d'ouverture en Europe du Nord et en Europe du Sud n'est pas la même. L'accessibilité des animaux rentrés dans les bâtiments peut également jouer un rôle important. Calvete *et al.*, (2009) suggèrent qu'étant donné l'accessibilité (par des ouvertures) des animaux présents à l'intérieur des bâtiments alors qu'aucun animal ne pâture à l'extérieur, le caractère mammophile de cette espèce prévaut certainement sur la tendance exophage. Ainsi, certaines espèces en recherche d'hôte peuvent s'adapter aux circonstances de disponibilité des hôtes et rentrer dans les bâtiments afin d'assurer leur survie. Nous avons observé également que les animaux environnants – dans notre étude le troupeau de bœufs – ont pu influencer les captures, attirant vers eux un certain nombre de *Culicoides* (on peut supposer que plus la masse des hôtes est importante, par les facteurs attractifs dégagés, plus cet effet est fort).

Si l'environnement dans lequel un *Culicoides* va émerger ne contient pas d'hôte préférentiel, comment se comporte-il pour accomplir son repas de sang ?

- Soit l'insecte pour assurer sa survie va se déplacer jusqu'à rencontrer un hôte préférentiel. Il peut alors soit s'adapter au nouvel environnement et s'installer à proximité de cet hôte, si des habitats larvaires sont disponibles, soit parcourir la distance pour aller se gorger et regagner son habitat larvaire initial.
- Soit l'insecte ne quitte pas son habitat mais va s'adapter aux hôtes qui l'entourent.

Cet exemple illustre la sélection d'un comportement spécifique *versus* opportuniste.

Peut-on s'attendre, chez les *Culicoides*, comme chez d'autres insectes hématophages, à des phénomènes d'apprentissage modifiant leurs préférences tropicales ?

C'est le cas chez *Anopheles arabiensis* Patton (McCall & Kelly 2002, McCall *et al.* 2001) et plusieurs espèces de *Culex* (*Culex tritaeniorhynchus* Giles, *Culex gelidus* Theobald *et Culex vishnui* s.l.) (Mwandawiro *et al.*, 2000) qui ont tendance à retourner vers l'espèce d'hôte sur laquelle les femelles se sont gorgées au précédent repas de sang. Cette tendance a également été démontré chez les mouches tsétsés *Glossina palpalis gambiensis* (Bouyer *et al.*, 2007). De plus, si la sélection d'un hôte parmi un groupe peut se faire en fonction de l'intensité des mouvements de défenses, on peut s'attendre à ce qu'un hôte affaibli ou malade montre moins de réaction de défense et soit par conséquent plus piqué. Un mouton infecté et affaibli peut être plus facilement la cible de *Culicoides*.

Les conditions météorologiques sont connues pour avoir un impact sur l'activité des adultes (Kettle, 1969; Mellor *et al.*, 2000). En effet, le vent inhiberait l'activité du vol des *Culicoides* (Kettle, 1969; Blackwell, 1997; Meiswinkel *et al.*, 2000), qui serait optimale avec des températures supérieures à 20 °C (Tsutsui *et al.*, 2010). L'humidité relative ainsi que la pluviométrie ont été positivement corrélées avec l'activité de vol de *C. impunctatus* (Blackwell, 1997). Récemment, Sanders *et al.* (2011) ont développé un modèle permettant de prédire l'abondance journalière des espèces de *Culicoides* au cours de l'année en fonction des conditions météorologiques. Les abondances fortes étaient associées à des températures élevées, un vent faible et des jours sans pluie, sauf pour *C. pulicaris* qui semble associé à des températures plus faibles. Cependant, l'effet des paramètres météorologiques n'a été significatif que sur les sites où l'abondance des *Culicoides* était élevée.

Nos résultats ont également suggéré une influence de la pression atmosphérique qu'il serait également intéressant d'étudier. De plus, au cours de notre étude, l'humidité relative n'a pas semblé influencer l'activité de recherche d'hôte et la température minimale requise (8 °C) semble être plus basse que celle annoncée par Tsutsui *et al.* (2010) pour *Culicoides maculatus* et *Culicoides oxystoma*. Il est possible que des différences existent entre espèces ou entre populations. Les conditions climatiques (vent, humidité), outre leur influence sur le vol des *Culicoides*, pourraient interférer sur la diffusion des odeurs.

Les changements en intensité lumineuse régissent l'activité de recherche d'hôte. Ainsi, durant la journée, si l'intensité lumineuse diminue fortement (ciel très couvert), on peut s'attendre à une reprise d'activité comme observé dans notre étude. En effet, le 16 juin, la luminosité a fortement diminué à partir de 14h00 (120 J/cm²) pour atteindre 20 J/cm² à 16h00, alors que les moyennes sur les autres jours de collecte sont restées à peu près constantes (226 J/cm² à 14h00, 225 J/cm² à 16h00). Parallèlement, lors d'une même cession à 15h20, 15 *C. obsoletus* ont été collectés. Ainsi deux situations peuvent se présenter, pendant lesquelles l'activité des *Culicoides* peut se prolonger durant le jour. La première situation, comme nous venons de le voir, est en cas de luminosité réduite par couverture nuageuse, comme cela a été décrit pour *C. impunctatus* et *C. obsoletus* (European Food Safety Authority, 2008). La deuxième situation est l'influence du cycle de la lune. Il est possible que l'activité de recherche d'hôte soit plus intense en cas d'illumination par la lune (*Culicoides variipennis* (Barnard and Jones, 1980); *C. mississippiensis*, *C. furens*, and *C. barbosa* (Lillie *et al.*, 1987)). Ce facteur serait intéressant à étudier sur l'activité des espèces paléarctiques. Les horaires de coucher et lever de soleil varient en fonction des localisations et des saisons entraînant un changement de comportement trophique entre populations d'une même espèce au cours de l'année. D'autres facteurs viennent modifier encore ce schéma. Par exemple, *C. obsoletus* a été actif avant le coucher de soleil au printemps et en automne, alors qu'en été cette espèce était plutôt active après le coucher de soleil vraisemblablement sous l'influence de la température et de l'hygrométrie. Bishop *et al.* (2004) a démontré que l'intensité et la couleur de la diode électroluminescente (LED) du piège lumineux était importante lors de la collecte. Le piégeage de *C. brevitarsis* a été plus efficace avec des LED à lumière verte à intensité grandissante. Lors de collectes avec piège à lumière ultraviolette, l'intensité du néon peut donc également avoir un rôle important.

La chaleur corporelle de l'hôte semble être également un stimulus important pour attirer les insectes hématophages, ceux-ci pouvant y être très sensibles. C'est le cas pour le vecteur de la fièvre jaune, *Ae. aegypti*, qui répond à un gradient de chaleur émis par l'hôte (Peterson and Brown, 1951). Le pou *Pediculus humanus* Linnaeus, cas particulier d'ectoparasite, répondant également aux changements de température, est capable de quitter l'hôte mort ou fébrile pour trouver un nouvel hôte sain (Wigglesworth, 1941). L'ajout de chaleur au piège lumineux appâté avec du CO₂ et de l'octénol augmente significativement la capture d'*Aedes taeniorhynchus* Wiedemann, *Anopheles atropos* Dyar and Knab, *Culex nigripalpus* et *Culicoides furens* (Poey) (Kline and Lemire, 1995).

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

Cette étude portant sur l'écologie des *Culicoides*, et plus particulièrement sur le contact hôte/vecteur, a nécessité l'utilisation de protocoles standardisés et a permis de développer deux pièges originaux, un piège collant et un piège à aspiration.

Ce travail a permis de décrire l'activité des espèces en recherche d'hôtes au cours du nyctémère, de déterminer leur capacité à rentrer dans les bâtiments pour se nourrir et d'étudier l'attraction face à des hôtes variés. A chaque fois, les différents facteurs de variabilité ont été pris en compte et plusieurs hypothèses ont été proposées. Cette étude a montré et confirmé à quel point les différents paramètres météorologiques peuvent influencer l'activité des *Culicoides* adultes et combien d'autres paramètres environnementaux ou paramètres liés au comportement et à la conformation de l'hôte peuvent rentrer en compte.

Le modèle virus de la FCO/*Culicoides* est intéressant car l'émergence de la FCO est liée à deux mécanismes distincts (remontée vers le nord d'un vecteur exotique et transmission de sérotypes exotiques par des vecteurs autochtones) et semble être liée à l'augmentation globale des températures. Ce travail a permis de souligner la complexité de la relation entre les espèces autochtones et leurs hôtes d'intérêt et montrer l'importance d'utiliser des méthodes de piégeage adaptées. Par ailleurs, l'utilisation de protocoles méthodiques et standardisés permet de mieux décrire le comportement trophique des espèces paléarctiques de *Culicoides*, même si ces résultats méritent d'être approfondis et étendus à d'autres écosystèmes.

En appliquant ces connaissances à d'autres systèmes, ces travaux permettent également de mieux appréhender les autres maladies vectorielles transmises par les *Culicoides*, telles que la peste équine, le virus Akabane ou le virus Oropouche, et également de mieux comprendre l'association entre insectes hématophages et hôtes vertébrés. Par exemple, dans le passé, des sérotypes de la peste équine ont été introduits et transmis dans le sud de l'Europe illustrant le risque d'émergence de cette maladie. Dans le cas d'une émergence de la peste équine dans l'ouest de l'Europe, ces études ont permis d'avoir une liste d'espèces attaquant le cheval (*C. scoticus*, *C. dewulfi* et *C. obsoletus*) et de commencer à décrire leur comportement trophique.

Plusieurs perspectives de travaux peuvent être proposées.

En utilisant ces méthodes, en particulier les procédures standardisées d'analyse de données, des collectes sur d'autres hôtes et dans d'autres conditions environnementales permettraient de mieux décrire le comportement trophique des espèces de *Culicoides*. Nous nous sommes limités à une seule étude des préférences trophiques. De nombreux facteurs liés à l'hôte peuvent faire varier les préférences trophiques (sexe, âge, race, couleur, etc.). Ces facteurs n'ont pas pu être étudiés : par exemple, tous les hôtes utilisés étaient des femelles. Il serait intéressant de poursuivre ces études en s'intéressant aux variations de comportement des espèces de *Culicoides* face aux différents facteurs liés à l'hôte, en particulier le sexe (émanation de phéromones). De plus, afin de limiter les effets croisés (différence de taille, poids, espèce) il serait de même intéressant de réitérer l'étude, en faisant varier le poids au sein d'une même espèce et varier ces espèces pour un même poids. Etudier le comportement de défense aiderait également à comprendre les relations au sein du triptyque

Culicoides/hôte/virus. Pour comprendre les différences d'attractivité entre ruminants, la même étude sur la préférence trophique peut être envisagée mais cette fois-ci sans le cheval.

La multiplicité des facteurs influençant l'activité des *Culicoides* ainsi que leurs interactions rendent complexes les mécanismes de transmission du virus de la FCO. A la lumière de nos travaux, une mesure de prévention pourrait être proposée. Par exemple, dans un élevage, il peut être conseillé de garder les animaux de valeur dans les bâtiments fermés en période de forte activité des *Culicoides* afin de limiter le risque d'attaque et donc de transmission de pathogènes. Mais il est difficile d'établir un protocole général de protection sans prendre en compte les multiples paramètres (température, luminosité, abondance d'hôte, saison) pouvant faire varier le comportement trophique des femelles. Voici une conséquence du processus évolutionniste sélectionnant la capacité de l'insecte hématophage à assurer sa rencontre avec un hôte dans un temps et un espace donné.

Aussi beaucoup reste à faire...

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adams, T.S., 1999. Hematophagy and hormone release. *Annals of the Entomological Society of America*, 92(1): 1-13.
- Adhami, J. and P. Reiter, 1998. Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14(3): 340-343.
- Adkisson, P.L., 1966. Internal clocks and insect diapause. *Science*, 154: 234-241.
- Alcaide, M., C. Rico, S. Ruiz, R. Soriguer, J. Munoz and J. Figuerola, 2009. Disentangling vector-borne transmission networks: a universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals. *PLoS One*, 4(9): e7092.
- Anderson, G.S., P. Belton and E.M. Belton, 1993. A population study of *Culicoides obsoletus* Meigen (Diptera, Ceratopogonidae), and other *Culicoides* species in the Fraser Valley of British-Columbia. *The Canadian Entomologist*, 125(3): 439-447.
- Anderson, G.S., P. Belton and N. Kleider, 1988. The hypersensitivity of horses to *Culicoides* bites in British Columbia. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne*, 29: 718-723.
- Anderson, J.R. and J.B. Hoy, 1972. Relationship between host attack rates and CO₂-baited insect flight trap catches of certain *Symphoromyia* species. *Journal of Medical Entomology*, 9(5): 373-393.
- Aranda, C., R. Eritja and D. Roiz, 2006. First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 20: 150-152.
- Auezova, G.A., 2008. Hosts and trophic specialization of bloodsucking biting midges (Diptera: Ceratopogonidae, Leptoconopidae) in southeastern Kazakhstan. *Russian Entomology Journal*, 17(1): 19-24.
- Balashov, Y.S., 1984. Interaction between blood-sucking arthropods and their hosts, and its influence on vector potential. *Annual Review of Entomology*, 29: 137-156.
- Balashov, Y.S., 1999. Evolution of haematophagy in insects and ticks. *Entomological Review*, 79(8): 943-954.
- Baldet, T., J.C. Delécolle, C. Cetre-Sossah, B. Mathieu, R. Meiswinkel and G. Gerbier, 2008. Indoor activity of *Culicoides* associated with livestock in the bluetongue virus (BTV) affected region of Northern France during autumn 2006. *Preventive Veterinary Medicine*, 87(1-2): 84-97.
- Balenghien, T., F. Fouque, P. Sabatier and D.J. Bicout, 2011. Theoretical formulation for mosquito host-feeding patterns: application to a West Nile virus focus of Southern France. *Journal of Medical Entomology*, 48(5): 1076-1090.
- Barataud, B., 2004. Des insectes comme nouvelle source de médicaments. In: *Insectes*. pp: 4.
- Barnard, B.J.H., 1997. Some factors governing the entry of *Culicoides* spp. (Diptera : Ceratopogonidae) into stables. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 64(3): 227-233.
- Barnard, D.R. and R.H. Jones, 1980. Diel and seasonal patterns of flight activity of Ceratopogonidae in Northeastern Colorado: *Culicoides*. *Environmental Entomology*, 9: 446-451.

- Bartsch, S., B. Bauer, A. Wiemann, P.H. Clausen and S. Steuber, 2009. Feeding patterns of biting midges of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* groups on selected farms in Brandenburg, Germany. *Parasitology Research*, 105(2): 373-380.
- Baylis, M., H. Parkin, K. Kreppel, S. Carpenter, P.S. Mellor and K.M. McIntyre, 2010. Evaluation of housing as a means to protect cattle from *Culicoides* biting midges, the vectors of bluetongue virus. *Medical and Veterinary Entomology*, 24(1): 38-45.
- Beckenbach, A.T. and A. Borkent, 2003. Molecular analysis of the biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit 2. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 27(1): 21-35.
- Bellis, G.A., L.F. Melville, N.T. Hunt and M.N. Hearnden, 2004. Temporal activity of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) on cattle near Darwin, Northern Territory, Australia. *Epidemiology and vectors*, 40(3): 324-328.
- Bellis, G.A. and D.J. Reid, 1996. Sampling bias in determining the parous rate of collections of *Culicoides brevitarsis* Kieffer and *Culicoides wadai* Kitaoka (Diptera: Ceratopogonidae). *Australian Journal of Entomology*, 35: 319-322.
- Bennett, J.W., 1973. Regional body surface of sheep. *Journal of Agricultural Science*, 81: 429-432.
- Berman, A., 2003. Effects of body surface area estimates on predicted energy requirements and heat stress. *Journal of Dairy Science*, 86: 3605-3610.
- Bhasin, A., A.J. Mordue and W. Mordue, 2000. Responses of the biting midge *Culicoides impunctatus* to acetone, CO₂ and 1-octen-3-ol in a wind tunnel. *Medical and Veterinary Entomology*, 14(3): 300-307.
- Bhasin, A., A.J. Mordue and W. Mordue, 2001. Field studies on efficacy of host odour baits for the biting midge *Culicoides impunctatus* in Scotland. *Medical and Veterinary Entomology*, 15(2): 147-156.
- Bidlingmayer, W.L., 1961. Field activity studies of adult *Culicoides furens*. *Annals of Entomological Society of America*, 59: 149-156.
- Bishop, A.L., I.M. Barchia and L.J. Spohr, 2000. Models for the dispersal in Australia of the arbovirus vector, *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera : Ceratopogonidae). *Preventive Veterinary Medicine*, 47(4): 243-254.
- Bishop, A.L., H.J. McKenzie and L.J. Spohr, 2008. Attraction of *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera : Ceratopogonidae) and *Culex annulirostris* Skuse (Diptera : Culicidae) to simulated visual and chemical stimuli from cattle. *Australian Journal of Entomology*, 47: 121-127.
- Bishop, A.L., L.J. Worrall, L.J. Spohr, H.J. McKenzie and I.M. Barchia, 2004. Improving light-trap efficiency for *Culicoides* spp. with light-emitting diodes. *Veterinaria Italiana*, 40 (3): 266-269.
- Blackwell, A., 1997. Diel flight periodicity of the biting midge *Culicoides impunctatus* and the effects of meteorological conditions. *Medical and Veterinary Entomology*, 11(4): 361-367.
- Blackwell, A., C. Dyer, A.J. Mordue, L.J. Wadhams and W. Mordue, 1994. Field and laboratory evidence for a volatile pheromone produced by parous females of the Scottish biting midge, *Culicoides impunctatus*. *Physiological Entomology*, 19(4): 251-257.
- Blackwell, A., C. Dyer, A.J. Mordue, L.J. Wadhams and W. Mordue, 1996. The role of 1-octen-3-ol as a host-odour attractant for the biting midge, *Culicoides impunctatus* Goetghebuer, and

- interactions of 1-octen-3-ol with a volatile pheromone produced by parous female midges. *Physiological Entomology*, 21(1): 15-19.
- Blackwell, A., A.J.M. Luntz and W. Mordue, 1992. Morphology of the antennae of 2 species of biting midge - *Culicoides impunctatus* (Goetghebuer) and *Culicoides nubeculosus* (Meigen) (Diptera, Ceratopogonidae). *Journal of Morphology*, 213(1): 85-103.
- Blackwell, A., A.J. Mordue and W. Mordue, 1994. Identification of bloodmeals of the Scottish biting midge, *Culicoides impunctatus*, by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Medical and Veterinary Entomology*, 8(1): 20-24.
- Boreham, P.F.L. and C. Garrett-Jones, 1973. Prevalence of mixed blood meals and double feeding in a malaria vector (*Anopheles sacharovi* Favre). *Bulletin of the World Health Organisation*, 6: 1-14.
- Borkent, A., 2011. World species of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). American Museum of Natural History, and Instituto Nacional de Biodiversidad 691-8th Ave. SE, Salmon Arm, British Columbia, V1E 2C2, Canada: pp: 234.
- Bouyer, J., M. Pruvot, Z. Bengaly, P.M. Guerin and R. Lancelot, 2007. Learning influences host choice in tsetse. *Biology letters -Animal behaviour*, 3: 113-116.
- Braverman, Y., 1970. An improved emergence trap for *Culicoides*. *Journal of Economic Entomology*, 63(5): 1674-1675.
- Braverman, Y., 1988. Preferred landing sites of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) on a horse in Israel and its relevance to summer seasonal recurrent dermatitis (sweet itch). *Equine Veterinary Journal*, 20(6): 426-429.
- Braverman, Y., P.F. Boreham and R. Galum, 1971. The origin of blood meals of female *Culicoides pallidipennis* trapped in a sheepfold in Israel. *Journal of Medical Entomology*, 8(4): 379-381.
- Braverman, Y. and F. Chechik, 1996. Air streams and the introduction of animal diseases borne on *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae) into Israel. *Revue Scientifique Et Technique De L'Office International Des Epizooties*, 15(3): 1037-1052.
- Braverman, Y., S. Rechtman, A. Frish and R. Braverman, 2003. Dynamics of biting activity of *C. imicola* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) during the year. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 58: 46-56.
- Braverman, Y., H. Ungar-Waron, K. Frith, H. Adler, Y. Danieli, K.P. Baker and P.J. Quinn, 1983. Epidemiological and immunological studies of sweet itch in horses in Israel. *Veterinary Record*, 112(22): 521-524.
- Calistri, P., M. Goffredo, V. Caporale and R. Meiswinkel, 2003. The distribution of *Culicoides imicola* in Italy: Application and evaluation of current Mediterranean models based on climate. *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 50(3): 132-138.
- Calvete, C., R. Estrada, M.A. Miranda, R. del Rio, D. Borrás, F.J. Beldron, A. Martínez, A.J. Calvo and J. Lucientes, 2009. Entry of bluetongue vector *Culicoides imicola* into livestock premises in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 23(3): 202-208.
- Campbell, J.A. and E.C. Pelham-Clinton, 1960. A taxonomic review of the British species of *Culicoides* Latreille (Diptera: Ceratopogonidae). *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, 68: 181-302.

- Campbell, M. and D. Kettle, 1979. Swarming of *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) with reference to markers, swarm size, proximity of cattle, and weather. Australian Journal of Zoology, 27(1): 17-30.
- Caracappa, S., A. Torina, A. Guercio, F. Vitale, A. Calabro, G. Purpari, V. Ferrantelli, M. Vitale and P.S. Mellor, 2003. Identification of a novel bluetongue virus vector species of *Culicoides* in Sicily. Veterinary Record, 153(3): 71-74.
- Carpenter, S., H.L. Lunt, D. Arav, G.J. Venter and P.S. Mellor, 2006. Oral susceptibility to bluetongue virus of *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) from the United Kingdom. Journal of Medical Entomology, 43(1): 73-78.
- Carpenter, S., C. McArthur, R. Selby, R. Ward, D.V. Nolan, A.J.M. Luntz, J.F. Dallas, F. Tripet and P.S. Mellor, 2008. Experimental infection studies of UK *Culicoides* species midges with bluetongue virus serotypes 8 and 9. Veterinary Record, 163(20): 589-592.
- Carpenter, S., C. Szmaragd, J. Barber, K. Labuschagne, S. Gubbins and P. Mellor, 2008. An assessment of *Culicoides* surveillance techniques in northern Europe: have we underestimated a potential bluetongue virus vector? Journal of Applied Ecology, 45(4): 1237-1245.
- Chandler, J.A., J. Parsons, P.F.L. Boreham and G.S. Gill, 1977. Seasonal variations in the proportions of mosquitoes feeding on mammals and birds at a heronry in Western Kenya. Journal of Medical Entomology, 14(2): 233-240.
- Chapman, J.W., D.R. Reynolds, A.D. Smith, E.T. Smith and I.P. Woiwod, 2004. An aerial netting study of insects migrating at high altitude over England. Bulletin of Entomological Research, 94(2): 123-136.
- Chapman, R.F., 1988. Odors and the feeding behavior of insects. Animal and Plant Sciences, 1(2): 208-212.
- Chernin, E., 1983. Sir Patrick Manson's studies on the transmission and biology of Filariasis. Reviews of Infectious Diseases, 5(1): 148-166.
- Clements, A.N., 1999. The biology of mosquitoes. Sensory reception and behaviour. New York: CABI. pp:
- Collins, R.C. and R.H. Jones, 1978. Laboratory transmission of *Onchocerca Cervicallis* with *Culicoides variipennis*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 27: 46-50.
- Combes, C., 2000. Selective pressure in host-parasite systems. Journal de la Société de Biologie, 194(1): 19-23.
- Combes, C., 2010. L'art d'être parasite: les associations du vivant. Paris. pp:
- Conte, A., A. Giovannini, L. Savini, M. Goffredo, P. Calistri and R. Meiswinkel, 2003. The effect of climate on the presence of *Culicoides imicola* in Italy. Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health, 50(3): 139-147.
- Conte, A., M. Goffredo, C. Ippoliti and R. Meiswinkel, 2007. Influence of biotic and abiotic factors on the distribution and abundance of *Culicoides imicola* and the Obsoletus Complex in Italy. Veterinary Parasitology, 150(4): 333-344.
- Corbet, P.S., 1966. The role of rhythms in insect behaviour. Royal Entomological Society of London, 3: 13-28.

- Cummings, E. and E.R. James, 1985. Prevalence of equine onchocerciasis in southeastern and midwestern United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 186(11): 1202-1203.
- Davies, J.B., 1966. An evaluation of the emergence or box trap for estimating sand fly (*Culicoides* spp. Heleidae) population. *Mosquito News*, 26(1): 69-72.
- de La Rocque, S., T. Balenghien, L. Halos, K. Dietze, F. Claes, G. Ferrari, V. Guberti and J. Slingenbergh, 2011. A review of trends in the distribution of vector-borne diseases: is international trade contributing to their spread? *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 30(1): 119-130.
- DeFoliart, G.R., 1989. The human use of insects as food and as animal feed. *Bulletin of the Entomological Society of America*: 22-28.
- Delécolle, J.-C., 1985. Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. Université Louis Pasteur, Strasbourg, France: pp: 238.
- Dijkstra, E., I.J.K. van der Ven, R. Melswinkel, D.R. Holzel, P.A. van Rijn and R. Meiswinkel, 2008. *Culicoides chiopterus* as a potential vector of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Record*, 162(13): 424-424.
- Dow, R.P., W.C. Reeves and R.E. Bellamy, 1957. Field tests of avian host preference of *Culex tarsalis* Coq. . *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 6: 294-303.
- Downes, J.A., 1950. Habits and life-cycle of *Culicoides nubeculosus* (Mg.). *Nature*, 166: 510-511.
- Downes, J.A., 1955. Observations on the swarming flight and mating of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 106: 213-236.
- Downes, J.A., 1978. Feeding and mating in the insectivorous Ceratopogonidae (Diptera). Ottawa: The Entomological Society Of Canada. pp: 62
- Du Toit, R.M., 1944. The transmission of bluetongue and horse-sickness by *Culicoides*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, 19: 7-16.
- Du Toit, R.M., 1962. The role played by bovines in the transmission of bluetongue in sheep. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, 33(4): 483-490.
- Dufour, D.L., 1987. Insects as food: a case study from the Northwest Amazon. *American Anthropologist*, 89(2): 383-397.
- Dukes, H.H., 1937. Studies on the energy metabolism of the Hen *Journal of Nutrition*: 341-354.
- Dyce, A.L., 1969. The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *Journal of the Australian Entomological Society*, 8: 11-15.
- Edman, J.D., 1974. Host-feeding patterns of Florida mosquitoes III *Culex* (*Culex*) and *Culex* (*NeoCulex*). *Journal of Medical Entomology*, 11: 95-104.
- Edman, J.D. and D.J. Taylor, 1968. *Culex nigripalpus*: seasonal shift in the bird-mammal feeding ratio in a mosquito vector of human encephalitis. *Science*, 161: 67-68.

- Edman, J.D., L.A. Webber and H.W.I. Kale, 1972. Effect of mosquito density on the interrelationship of host behavior and mosquito feeding success American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 4(487-491).
- Edwards, F.W., 1923. New and old observations on Ceratopogonidae midges attacking other insects. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 17: 19-29.
- European Food Safety Authority, E.F.S.A., 2008. Bluetongue Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (Question No EFSA-Q-2007-201) adopted on 19 June 2008. the EFSA Journal, 735: 1-70.
- Garcia-Saenz, A., P. McCarter and M. Baylis, 2011. The influence of host number on the attraction of biting midges, *Culicoides* spp., to light traps. Medical and Veterinary Entomology, 25: 113-115.
- Garrett-Jones, C., 1964. Prognosis for interruption of malaria transmission through assessment of the mosquito's vectorial capacity. Nature, 204: 1173-1175.
- Garrett-Jones, C. and G.R. Shidrawi, 1969. Malaria vectorial capacity of a population of *Anopheles gambiae*. An exercise in epidemiological entomology. Bulletin World Health Organisation, 40: 531-545.
- Garros, C., L. Gardès, X. Allène, I. Rakotoarivony, E. Viennet, S. Rossi and T. Balenghien, 2011. Adaptation of a species-specific multiplex PCR assay for the identification of blood meal source in *Culicoides* (Ceratopogonidae: Diptera): applications on Palaearctic biting midge species, vectors of Orbiviruses. Infection, Genetics and Evolution, 11(5): 1103-1110.
- Garros, C., B. Mathieu, T. Balenghien, C. Cetre-Sossah and J.C. Delecolle, 2010. Suggesting synonymies? Comments on Kiehl et al. (2009) "The European vectors of Bluetongue virus: are there species complexes, single species or races in *Culicoides obsoletus* and *C. pulicaris* detectable by sequencing ITS-1, ITS-2 and 18S-rDNA?". Parasitology Research, 107(3): 731-734.
- Gerbier, G., C. Sailleau, E. Bréard, C. Viarouge, A. Desprat, L. Lasne, L. Gouyet, A. Desvars, T. Baldet, F. Biteau, J.-C. Delécolle, C. Garros, F. Roger and S. Zientara, 2011. Epidémiologie comparée des orbivirus en Guadeloupe et à la Réunion. Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation, 43(Spécial DOM-TOM).
- Gerdes, G.H., 2004. A South African overview of the virus, vectors, surveillance and unique features of bluetongue. Veterinaria Italiana, 40(3): 39-42.
- Gerry, A.C., V.S.I. Monteys, J.O.M. Vidal, O. Francino and B.A. Mullens, 2009. Biting rates of *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) on sheep in northeastern Spain in relation to midge capture using UV light and carbon dioxide-baited traps. Journal of Medical Entomology, 46(3): 615-624.
- Gingrich, J.B. and G.M. Williams, 2005. Host-feeding patterns of suspected West Nile virus mosquito vectors in Delaware, 2001-2002. Journal of the American Mosquito Control Association, 21(2): 194-200.
- Glick, P.A., 1939. The distribution of insects, spiders, and mites in the air. Technical Bulletin U. S. Department of Agriculture, 673: 1-150.
- Goffredo, M., A. Buttigieg, R. Meiswinkel, J.C. Delecolle and S. Chircop, 2004. Entomological surveillance for bluetongue on Malta: first report of *Culicoides imicola* Kieffer. Bluetongue, Pt 1, Proceedings, 40(3): 278-281.

- Gomez-Tejedor, C., 2004. Brief overview of the bluetongue situation in Mediterranean Europe, 1998-2004. *Veterinaria Italiana*, 40(3): 57-60.
- Goodschild, A.J.P., 1955. Some observations on growth and egg production of the blood-sucking Reduviids, *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology, 30(10-12): 137-144.
- Grant, A.J. and D.L. Kline, 2003. Electrophysiological responses from *Culicoides* (Diptera : ceratopogonidae) to stimulation with carbon dioxide. *Journal of Medical Entomology*, 40(3): 284-292.
- Greany, P.D., S.B. Vinson and W.J. Lewis, 1984. Insect parasitoids: finding new opportunities biological control. *BioScience*, 34(11): 690-696.
- Grech, K., K. Watt and A.F. Read, 2006. Host-parasite interactions for virulence and resistance in a malaria model system. *Journal of Evolutionary Biology*, 19(5): 1620-1630.
- Greiner, E.C., E.S. Eveleigh and W.M. Bonne, 1978. Ornithophilic *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) from New Brunswick, Canada, and implications of their involvement in Haemoproteid transmission. *Journal of Medical Entomology*, 14(6): 701-704.
- Greiner, E.C., V.A. Fadok and E.B. Rabin, 1990. Equine *Culicoides* hypersensitivity in Florida: biting midges aspirated from horses. *Medical and Veterinary Entomology*, 4(4): 375-381.
- Gubbins, S., S. Carpenter, M. Baylis, J.L.N. Wood and P.S. Mellor, 2008. Assessing the risk of bluetongue to UK livestock: uncertainty and sensitivity analyses of a temperature-dependent model for the basic reproduction number. *Journal of the Royal Society Interface*, 5(20): 363-371.
- Haddow, A.J. and G.W.A. Dick, 1948. Catches of biting Diptera in Uganda, with anaesthetized monkeys as bait. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 42(3-4): 271-277.
- Hair, J.A. and E.C. Turner, 1968. Preliminary host preference studies on Virginia *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Mosquito News*, 28(1): 103-107.
- Hardy, A.C. and L. Cheng, 1986. Studies in the distribution of insects by aerial currents: 3. Insect drift over the sea. *Ecological Entomology*, 11: 283-290.
- Hardy, W.T. and D.A. Price, 1952. Soremuzzle of sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 120: 23-25.
- Hendry, G. and G. Godwin, 1988 Biting midges in Scottish forestry: a costly irritant or a trivial nuisance? *Scottish Forestry*, 42: 113-119.
- Henning, M.W., 1956. Animal Diseases in South Africa. South Africa. pp: 877
- Hii, J., M. Chew, V. Sang, L. Munstermann, S. Tan, S. Panyim and S. Yasothornsrikul, 1991. Population genetic analysis of host seeking and resting behaviors in the malaria vector, *Anopheles balabacensis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 28: 675-684.
- Hoffmann, B., B. Bauer, C. Bauer, H.J. Batza, M. Beer, P.H. Clausen, M. Geier, J.M. Gethmann, E. Kiel, G. Liebisch, A. Liebisch, H. Mehlhorn, G.A. Schaub, D. Werner and F.J. Conraths, 2009. Monitoring of Putative Vectors of Bluetongue Virus Serotype 8, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 15(9): 1481-1484.

- Humair, P.-F., V. Douet, F. Moran Cadenas, L. Schouls, I. Van De Pol and L. Gern, 2007. Molecular identification of blood meal source in *Ixodes ricinus* ticks using I2S rDNA as a genetic marker. *Journal of Medical Entomology*, 44: 869-880.
- Humphreys, J.G. and J.E.C. Turner, 1973. Blood-feeding activity of female *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, 10(1): 79-83.
- Johansen, C.A., R.A. Farrow, A. Morrisen, P. Foley, G.A. Bellis, A.F. van den Hurk, B. Montgomery, J.S. Mackenzie and S.A. Ritchie, 2003. Collection of wind-borne haematophagous insects in the Torres Strait, Australia. *Medical and Veterinary Entomology*, 17: 102-109.
- Johnson, G., N. Panella, K. Hale and N. Komar, 2010. Detection of West Nile virus in stable flies (Diptera: Muscidae) parasitizing juvenile American white pelicans. *Journal of Medical Entomology*, 47: 1205-1211.
- Kay, B.H., P.F.L. Boreham and G.M. Williams, 1979. Host preferences and feeding patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) at Kowanyama, Cape York Peninsula, northern Queensland. *Bulletin of Entomological Research*, 69: 441-457.
- Kay, B.H., A.M. Boyd, P.A. Ryan and R.A. Hall, 2007. Mosquito feeding patterns and natural infection of vertebrates with Ross River and Barmah Forest viruses in Brisbane, Australia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(3): 417-423.
- Kelly, D.W., 2001. Why are some people bitten more than others? *Trends in Parasitology*, 17: 578-581.
- Kettle, D.S., 1951. The spatial distribution of *Culicoides impunctatus* Goet. under woodland and moorland conditions and its flight range through woodland. *Bulletin of Entomological Research*, 42: 239-291.
- Kettle, D.S., 1960. The flight of *Culicoides impunctatus* Goetghebuer (Diptera: Ceratopogonidae) over moorland and its bearing on midge control. *Bulletin of Entomological Research*, 51: 461-490.
- Kettle, D.S., 1962. The bionomics and control of *Culicoides* and *Leptoconops* (Diptera, Ceratopogonidae=Heleidae). *Annual Review of Entomology*, 7: 401-418.
- Kettle, D.S., 1969. The biting habits of *Culicoides furens* (Poey) and *C. barbosai* Wirth & Blanton. I. The 24-h cycle, with a note on differences between collectors. *Bulletin of Entomological Research*, 59: 21-31.
- Kettle, D.S., 1969. The biting habits of *Culicoides furens* (Poey) and *C. barbosai* Wirth & Blanton. II. Effects of meteorological conditions. *Bulletin of Entomological Research*, 59: 241-258.
- Kettle, D.S., P.B. Edwards and A. Barnes, 1998. Factors affecting numbers of *Culicoides* in truck traps in coastal Queensland. *Medical and Veterinary Entomology*, 12(4): 367-377.
- Kilpatrick, A.M., L.D. Kramer, M.J. Jones, P.P. Marra and P. Daszak, 2006. West Nile virus epidemics in North America are driven by shifts in mosquito feeding behavior. *Plos Biology*, 4: 606-610.
- Kline, D.L., D.V. Hagan and J.R. Wood, 1994. *Culicoides* responses to 1-octen-3-ol and carbon-dioxide in salt marshes near Sea Island, Georgia, USA. *Medical and Veterinary Entomology*, 8(1): 25-30.

- Kline, D.L. and G.E. Lemire, 1995. Field evaluation of heat as an added attractant to traps baited with carbon dioxide and octenol for *Aedes taeniorhynchus*. Journal of the American Mosquito Control Association, 11(4): 454-456.
- Laird, M., 1946. A Ceratopogonide midge (*Culicoides anophelis* Edwards, 1922) sucking engorged blood from a mosquito (*Armigeres lacuum* Edwards, 1922) at Palmamal, New Britain. Transactions of the Royal Society of the New Zealand, 76(2): 158-161.
- Land, M.F., G. Gibson, J. Horwood and J. Zeil, 1999. Fundamental differences in the optical structure of the eyes of nocturnal and diurnal mosquitoes. Journal of Comparative Physiology a- Sensory Neural and Behavioral Physiology, 185(1): 91-103.
- Lardeux, F., P. Loayza, B. Bouchité and T. Chavez, 2007. Host choice and human blood index of *Anopheles pseudopunctipennis* in a village of the Andean valleys of Bolivia. Malaria Journal, 6: 1-14.
- Lassen, S.B., S.A. Nielsen, H. Skovgard and M. Kristensen, 2011. Molecular identification of bloodmeals from biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides* Latreille) in Denmark. Parasitology Research, 108(4): 823-829.
- Lehane, M.J., 2005. The biology of blood-sucking in insects Second Edition Edn. pp: 321
- Lillie, T.H., D.L. Kline and D.W. Hall, 1987. Diel and seasonal activity of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) Near Yankeetown, Florida, Monitored with a vehicle-mounted insect trap. Journal of Medical Entomology, 24: 503-511.
- Lillie, T.H., W.C. Marquard and R.H. Jones, 1981. The flight range of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). The Canadian Entomologist, 133: 419-426.
- Linden, A., F. Gregoire, A. Nahayo, D. Hanrez, B. Mousset, A.L. Massart, I. De Leeuw, E. Vandemeulebroucke, F. Vandenbussche and K. De Clercq, 2010. Bluetongue virus in wild deer Belgium, 2005-2008. Emerging Infectious Diseases, 16: 833-836.
- Linhares, A.X. and J.R. Anderson, 1990. The influence of temperature and moonlight on flight activity of *Culicoides variipennis* (Coquillett) (Diptera: Ceratopogonidae) in northern California. Pan-Pacific Entomologist, 66(3): 199-207.
- Linley, J.R. and G.M. Adams, 1972. Ecology and behavior of immature *Culicoides melleus* (Coq.) (Dipt., Ceratopogonidae). Bulletin of Entomological Research, 62: 113-127.
- Linley, J.R., F.D.S. Evans and H.T. Evans, 1970. Seasonal emergence of *Culicoides furens* (Diptera: Ceratopogonidae) at Vero Beach, Florida. Annals of the Entomological Society of America, 63(5): 1332-1339.
- Lounibos, L.P., 2002. Invasions by insect vectors of human disease. Annual Review of Entomology, 47: 233-266.
- Lyimo, I.N. and H.M. Ferguson, 2009. Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. Trends in Parasitology, 25(4): 189-196.
- Macdonald, G., 1950. The analysis of infection rates in diseases in which superinfection occurs. Tropical Diseases Bulletin, 47(10): 907-915.
- MacLachlan, N.J., 2011. Bluetongue: History, global epidemiology, and pathogenesis. Preventive Veterinary Medicine: 1-5.

- Maclachlan, N.J. and G. Gard, 2009. Clinical signs and pathology. In: Bluetongue, P. S. Mellor, M. Baylis and P. P. C. Mertens, (Eds.). Elsevier: pp: 285-293.
- Mands, V., D.L. Kline and A. Blackwell, 2004. *Culicoides* midge trap enhancement with animal odour baits in Scotland. Medical and Veterinary Entomology, 18(4): 336-342.
- Marini, F., B. Caputo, G. Tarsitani and A. Della Torre, 2010. Study of *Aedes albopictus* dispersal in Rome, Italy, using sticky traps in mark-release-recapture experiments. Medical and Veterinary Entomology, 24: 361-368.
- Martinez-de la Puente, J., S. Merino, G. Tomas, J. Moreno, J. Morales, E. Lobato, S. Talavera and V.S.I. Monteys, 2009. Factors affecting *Culicoides* species composition and abundance in avian nests. Parasitology, 136(9): 1033-1041.
- McCall, P.J. and A.J. Trees, 1993. Onchocerciasis in British cattle: a study of the transmission of *Onchocerca* sp. in North Wales. Journal of Helminthology, 67: 123-135.
- Meiswinkel, R., T. Baldet, R. De Deken, W. Takken, J.-C. Delécolle and P.S. Mellor, 2007. Epidemiological analysis of the 2006 bluetongue virus serotype 8 epidemic in north-western Europe. Appendix 9: Distribution and dynamics of vector species., B. E. W. G. European Food Safety Authority (Ed.). pp: 88.
- Meiswinkel, R., T. Baldet, R. de Deken, W. Takken, J.C. Delecolle and P.S. Mellor, 2008. The 2006 outbreak of bluetongue in northern Europe - The entomological perspective. Preventive Veterinary Medicine, 87(1-2): 55-63.
- Meiswinkel, R., M. Baylis and K. Labuschagne, 2000. Stabling and the protection of horses from *Culicoides bolitinos* (Diptera : Ceratopogonidae), a recently identified vector of African horse sickness. Bulletin of Entomological Research, 90(6): 509-515.
- Meiswinkel, R., M. Goffredo, E.G.M. Dijkstra, I.J.K. van der Ven, T. Baldet and A. Elbers, 2008. Endophily in *Culicoides* associated with BTV-infected cattle in the province of Limburg, South-Eastern Netherlands, 2006. Preventive Veterinary Medicine, 87(1-2): 182-195.
- Meiswinkel, R., L.M. Gomulski, J.-C. Delécolle, M. Goffredo and G. Gasperi, 2004. The taxonomy of *Culicoides* vector complexes - unfinished business. Veterinaria Italiana, 40 (3): 151-159.
- Mellor, P.S., 2004. Infection of the vectors and bluetongue epidemiology in Europe. Veterinaria Italiana, 40 (3): 176-181.
- Mellor, P.S., J. Boned, C. Hamblin and S. Graham, 1990. Isolation of African horse sickness virus from vectors insects made during the 1988 epizootic in Spain. Epidemiology and Infection, 105: 447-454.
- Mellor, P.S., J. Boorman and M. Baylis, 2000. *Culicoides* biting midges: Their role as arbovirus vectors. Annual Review of Entomology, 45: 307-340.
- Mellor, P.S., S. Carpenter, L. Harrup, M. Baylis and P.P.C. Mertens, 2008. Bluetongue in Europe and the Mediterranean basin: history of occurrence prior to 2006. Preventive Veterinary Medicine, 87(1-2): 4-20.
- Mellor, P.S. and J. McCaig, 1974. The probable cause of "sweet itch" in England. Veterinary Record, 95: 411-415.

- Miller, B.R. and M.E. Ballinger, 1988. *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 476-477.
- Miller, W.H., G.D. Bernard and J.L. Allen, 1968. The optics of insect compound eyes - Microcomponents with dimensions near a wavelength of light cause observable optical effects. *Science*, 162: 758-767.
- Miranda, M.A., D. Borrás, C. Rincon and A. Alemany, 2003. Presence in the Balearic Islands (Spain) of the midges *Culicoides imicola* and *Culicoides obsoletus* group. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(1): 52-54.
- Moore, J., 1984. Altered behavioral responses in intermediate hosts - An Acanthocephalan parasite strategy. *The American Naturalist*, 123(4): 572-577.
- Moore, J., 1993. Parasites and the behavior of biting flies. *Journal of Parasitology*, 79(1): 1-16.
- Morse, S.S., 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 1(1): 7-15.
- Mukabana, W.R., W. Takken and B.G.J. Knols, 2002. Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. *Trends in Parasitology*, 18(11): 505-509.
- Mullens, B.A., 1995. Flight activity and response to carbon-dioxide of *Culicoides variipennis sonorensis* (Diptera, Ceratopogonidae) in Southern California. *Journal of Medical Entomology*, 32(3): 310-315.
- Mullens, B.A., A.C. Gerry, V.S.I. Monteys, M. Pinna and A. Gonzalez, 2010. Field studies on *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) activity and response to deltamethrin applications to sheep in northeastern Spain. *Journal of Medical Entomology*, 47: 106-110.
- Mullens, B.A., J.P. Owen, D.E. Heft and R.V. Sobeck, 2005. *Culicoides* and other biting flies on the Palos Verdes Peninsula of Southern California, and their possible relationship to equine dermatitis. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21(1): 90-95.
- Murray, M.D., 1970. The identification of blood meals in biting midges (*Culicoides*: Ceratopogonidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 64(1): 115-122.
- Murray, M.D., 1987. Akabane epizootics in New South Wales: evidence for long-distance dispersal of the biting midge *Culicoides brevitarsis*. *Australian Veterinary Journal*, 64(10): 305-308.
- Murray, M.D., 1987. Local dispersal of the biting midge *Culicoides brevitarsis* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) in south-eastern Australia. *Australian Journal of Zoology*, 35: 559-573.
- Murray, M.D. and P.D. Kirkland, 1995. Bluetongue and Douglas virus activity in New-South-Wales in 1989 - Further evidence for long-distance dispersal of the biting midge *Culicoides brevitarsis*. *Australian Veterinary Journal*, 72(2): 56-57.
- Mwandawiro, C., M. Boots, N. Tuno, W. Suwonkerd, Y. Tsuda and M. Takagi, 2000. Heterogeneity in the host preference of Japanese encephalitis vectors in Chiang Mai, northern Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94: 238-242.
- Nelson, R.L., 1965. Carbon dioxide as an attractant for *Culicoides*. *Journal of Medical Entomology*, 2: 56-57.

- Nelson, R.L. and R.E. Bellamy, 1971. Patterns of flight activity of *Culicoides variipennis* (Coquillett) (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, 8(3): 283-291.
- Nelson, W.A., J.E. Keirans, J.F. Bell and C.M. Clifford, 1975. Host-ectoparasite relationships. *Journal of Medical Entomology*, 12(2): 143-266.
- Nevill, E.M., 1978. The use of cattle to protect sheep from bluetongue infection. *Journal of the South African Veterinary Association*, 49(2): 129-130.
- Nevill, E.M. and D. Anderson, 1972. Host preferences of *Culicoides* midges (Diptera: Ceratopogonidae) in South Africa as determined by precipitin tests and light trap catches. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 39(3): 147-152.
- Nielsen, B.O. and O. Christensen, 1975. A mass attack by biting midge *Culicoides nubeculosus* (Mg.) (Diptera, Ceratopogonidae) on grazing cattle in Denmark a new aspect of sewage discharge. *Nordisk veterinærmedicin*, 27: 365-372.
- Ninio, C., D. Augot, B. Dufour and J. Depaquit, 2011. Emergence of *Culicoides obsoletus* from indoor and outdoor breeding sites. *Veterinary Parasitology*: 1-5.
- Ninio, C., D. Augot, H. Ferte, E. Breard, T. Lilin, S. Zientara, P.S. Mellor, B. Dufour and J. Depaquit, 2010. A Method for assessing the vectorial competence of field collected *Culicoides* Spp. for Bluetongue virus. *Parasite-Journal De La Societe Francaise De Parasitologie*, 17(2): 172-172.
- Nolan, D.V., S. Carpenter, J. Barber, P.S. Mellor, J.F. Dallas, A.J. Mordue and S.B. Pierrney, 2007. Rapid diagnostic PCR assays for members of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* species complexes, implicated vectors of bluetongue virus in Europe. *Veterinary Microbiology*, 124(1-2): 82-94.
- Nutall, G.H.F., L. Cobbett and T. Strangeways-Pigg, 1901. Studies in relation to Malaria - The geographical distribution of *Anopheles* in relation to the former distribution of Ague in England. *Journal of hygiene*, 1(1): 4-44.
- Oman, P., 1968. Prevention, surveillance and management of invading pest insects. *Bulletin of the Entomological Society of America*, 14(2): 98-102.
- Organisation Mondiale de la Santé, O.M.S., 1967. Les arbovirus et leur rôle dans la pathologie humaine. In: *Organisation Mondiale de la Santé - Série de Rapports Techniques*, O. M. d. I. Santé (Ed.). Genève: pp: 1-89.
- Otranto, D., J.R. Stevens, C. Cantacessi and R.B. Gasser, 2008. Parasite transmission by insects: a female affair? *Trends in Parasitology*, 24(3): 116-120.
- Ottley, M.I., C. Dallemagne and D.E. Moorhouse, 1983. Equine onchocerciasis in Queensland and the Northern Territory of Australia. *Australian Veterinary Journal*, 60: 200-203.
- Overgaard Nielsen, B., 1971. Some observations on biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) attacking grazing cattle in Denmark. *Entomologica Scandinavica*, 2: 94-98.
- Panagiotatos, D.E., 2004. Regional overview of bluetongue viruses, vectors, surveillance and unique features in Eastern Europe between 1998 and 2003. *Veterinaria Italiana*, 40(3): 61-72.
- Pant, C.P., V. Houba and H.D. Engers, 1987. Blood meal identification in vectors. *Parasitology Today*, 3: 324-326.

- Peterson, D.G. and A.W.A. Brown, 1951. Studies of the responses of the female *Aedes* Mosquito. Part III. The response of *Aedes aegypti* (L.) to a warm body and its radiation. Bulletin of Entomological Research, 42(03): 535-541.
- Pinheiro, F.P., A.P.A. Travassos da Rosa, J.F.S. Travassos da Rosa, R. Ishak, R.B. Freitas, M.L.C. Gomes and O.F.P. Oliva, 1981. Oropouche virus I. a review of clinical , epidemiological and ecological findings. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 30(1): 149-160.
- Ponçon, N., T. Balenghien, C. Toty, J.B. Ferre, C. Thomas, A. Dervieux, G. L'Ambert, F. Schaffner, O. Bardin and D. Fontenille, 2007. Effects of local anthropogenic changes on potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* and west nile virus vector *Culex modestus*, Camargue, France. Emerging Infectious Diseases, 13(12): 1810-1815.
- Purse, B.V., P.S. Mellor, D.J. Rogers, A.R. Samuel, P.P.C. Mertens and M. Baylis, 2005. Climate change and the recent emergence of bluetongue in Europe. Nature Reviews Microbiology, 3(2): 171-181.
- Purse, B.V., N. Nedelchev, G. Georgiev, E. Veleva, J. Boorman, E. Denison, E. Veronesi, S. Carpenter, M. Baylis and P.S. Mellor, 2006. Spatial and temporal distribution of bluetongue and its *Culicoides* vectors in Bulgaria. Medical and Veterinary Entomology, 20(3): 335-344.
- Purse, B.V. and D.J. Rogers, 2009. Bluetongue virus and climate change. In: Bluetongue, P. S. Mellor, M. Baylis and P. P. C. Mertens, (Eds.). Elsevier: pp: 343-364.
- R Development Core Team, R: A language and environment for statistical computing. <http://cran.r-project.org/manuals.html>.
- R Development Core Team, 2008. An Introduction to R: Notes on R, A Programming Environment for Data Analysis and Graphics. R. F. f. S. Computing (Ed.). Vienna, Austria.
- Raich, T., M. Jacobson, F. Holbrook, R. Babion, C. Blair and B. Beaty, 1997. *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) host selection in Colorado. Journal of Medical Entomology, 34(2): 247-249.
- Reiter, P., 1998. *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come? pp: 83-94
- Reye, E.J. and D.J. Lee, 1963. The influence of the tide cycle on certain species of *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae). The Proceedings of the Linnean Society of New South Wales, 87: 377-387.
- Reynolds, D.R., A.D. Smith and J.W. Chapman, 2008. A radar study of emigratory flight and layer formation by insects at dawn over southern Britain. Bulletin of Entomological Research, 98: 35-52.
- Rhodain, F. and C. Perez, 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire - Notions d'épidémiologie des maladies à vecteurs. Paris. pp: 458
- Riek, R.F., 1953. Studies on allergic dermatitis ('Queensland itch') of the horse. I. Description, distribution, symptoms and pathology. Australian Veterinary Journal, 29: 177-184.
- Roberts, D. and S. Kumar, 1994. Using vehicle-mounted nets for studying activity of Arabian sand flies (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology, 31: 388-393.
- Sanders, C.J., R. Selby, S. Carpenter and D.R. Reynolds, 2011. High-altitude flight of *Culicoides* biting midges. Veterinary Record, 168(8): 208.

- Sanders, C.J., C.R. Shortall, S. Gubbins, L. Burgin, J. Gloster, R. Harrington, D.R. Reynolds, P.S. Mellor and S. Carpenter, 2011. Influence of season and meteorological parameters on flight activity of *Culicoides* biting midges. *Journal of Applied Ecology*: 1-10.
- Savini, G., M. Goffredo, F. Monaco, A. Di Gennaro, M.A. Cafiero, L. Baldi, P. De Santis, R. Meiswinkel and V. Caporale, 2005. Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides*, Diptera : ceratopogonidae) in Italy. *Veterinary Record*, 157(5): 133-139.
- Schaub, G.A., 2006. Parasitogenic alterations of vector behavior. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(1): 37-40.
- Schmidt, K.A. and R.S. Ostfeld, 2001. Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology*, 82(3): 609-619.
- Schmidtman, E.T., J.F. Abend and M.E. Valla, 1980. Nocturnal blood-feeding from pastured calves by the Ceratopogonid midge, *Culicoides venustus*, in New York State. *Mosquito News*, 40(4): 571-577.
- Schmidtman, E.T., C.J. Jones and B. Gollands, 1980. Comparative host-seeking attractivity of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) attracted to pastured livestock in Central New York State, USA. *Journal of Medical Entomology*, 17(3): 221-231.
- Sellers, R.F., 1980. Weather, host and vector - their interplay in the spread of insect-borne animal virus diseases. *Journal of Hygiene (London)*, 85(1): 65-102.
- Service, M.W., 1977. A critical review of procedures for sampling populations of adult mosquitoes. *Bulletin of Entomological Research*, 67: 343-382.
- Sherman, R.A. and E.A. Pechter, 1988. Maggot therapy: a review of the therapeutic applications of fly larvae in human medicine, especially for treating osteomyelitis. *Medical and Veterinary Entomology*, 2: 225-230.
- Silver, J.B. and M.W. Service, 2008. Sampling adults by animal bait catches and by animal-baited traps. In: *Mosquito ecology field sampling methods*. Springer, Dordrecht, the Netherlands: pp: 493-675.
- Simard, F., E. Nchoutpouen, J.C. Toto and D. Fontenille, 2005. Geographic distribution and breeding site preference of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) in Cameroon, Central Africa. *Journal of Medical Entomology*, 42(5): 726-731.
- Slingenbergh, J., M. Gilbert, K. de Balogh and W. Wint, 2004. Ecological sources of zoonotic diseases. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 23(2): 467-484.
- Solano, P., G. Duvallet, V. Dumas, D. Cuisance and G. Cuny, 1997. Microsatellite markers for genetic population studies in *Glossina palpalis* (Diptera: Glossinidae). *Acta Tropica*, 65: 175-180.
- Stahl, W.R., 1967. Scaling of respiratory variables in mammals. *Journal of Applied Physiology*, 22: 453-460.
- Sullivan, M.F., D.J. Gould and S. Maneechai, 1971. Observations on the host range and feeding preferences of *Aedes albopictus* (Skuse). *Journal of Medical Entomology*, 8(6): 713-716.

- Sutcliffe, F., D.J. Steer and D. Beardsall, 1995. Studies of host location behaviour in the black fly *Simulium articum* (IIS - 10.11) (Diptera: Simuliidae): aspects of close range trap orientation. *Bulletin of Entomological Research*, 85: 415-424.
- Swellengrebel, N.H., 1929. La dissociation des fonctions sexuelles et nutritives (dissociations gonotrophiques) d'*Anopheles maculipennis* comme cause du Paludisme dans les Pays-Bas et ses rapports avec l'"infection domiciliaire". *Annales de l'Institut Pasteur*, 43 1370-1389.
- Tabachnick, W.J., 2004. *Culicoides* and the global epidemiology of bluetongue virus infection. *Bluetongue*, Pt 1, *Proceedings*, 40(3): 145-150.
- Tabachnick, W.J., 2010. Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistystems in a changing world. *The Journal of Experimental Biology*, 213: 946-954.
- Takken, W., N. Verhulst, E.J. Scholte, F. Jacobs, Y. Jongema and R. van Lammeren, 2008. The phenology and population dynamics of *Culicoides* spp. in different ecosystems in The Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine*, 87(1-2): 41-54.
- Tanner, G.D. and J.E.C. Turner, 1974. Vertical activities and host preferences of several *Culicoides* species in a southwestern Virginia Forest. *Mosquito News*, 34(1): 66-70.
- Tauber, C.A. and M.J. Tauber, 1981. Insect seasonal cycles: genetics and evolution. *Annual Review of Ecology and Sytematics*, 12: 281-308.
- Tempelis, C.H., 1975. Host-feeding patterns of mosquitoes, with a review of advances in analysis of blood meals by serology. *Journal of Medical Entomology*, 11(6): 635-653.
- Tempelis, C.H. and R.L. Nelson, 1971. Blood-feeding patterns of midges of the *Culicoides variipennis* complex in Kern county, California. *Journal of Medical Entomology*, 8(5): 532-534.
- Thorsteinson, A.G. and G.K. Bracken, 1965. The orientation behavior of horse flies and deer flies (Tabanidae: Diptera). III. The use of traps in the study of orientation of tabanids in the field. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 8: 189-192.
- Tomioka, K. and T. Sakamoto, 2006. History dependence of insect circadian rhythms. *Formosan Entomologist*, 26: 87-97.
- Torina, A., S. Caracappa, P.S. Mellor, M. Baylis and B.V. Purse, 2004. Spatial distribution of bluetongue virus and its *Culicoides* vectors in Sicily. *Medical and Veterinary Entomology*, 18(2): 81-89.
- Townley, P., K.P. Baker and P.J. Quinn, 1984. Preferential landing and engorging sites of *Culicoides* species landing on a horse in Ireland. *Equine Veterinary Journal*, 16(2): 117-120.
- Townzen, J.S., A.V.Z. Brower and D.D. Judd, 2008. Identification of mosquito bloodmeals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, 22: 386-393.
- Tsutsui, T., Y. Hayama, M. Yamakawa, H. Shirafuji and T. Yanase, 2010. Flight behavior of adult *Culicoides oxystoma* and *Culicoides maculatus* under different temperatures in the laboratory. *Parasitol Res*, 108(6): 1575-1578.
- U. S.Environmental Protection Agency, 1993. *Wildlife Exposure Factors Handbook*. Washington, DC, USA. pp: 588

- van der Rijt, R., R. van den Boom, Y. Jongema and M.M. van Oldruitenborgh-Oosterbaan, 2008. *Culicoides* species attracted to horses with and without insect hypersensitivity. The Veterinary Journal, 178(1): 91-97.
- Vanbinst, T., F. Vandenbussche, E. Vandemeulebroucke, I. De Leeuw, I. Deblauwe, G. De Deken, M. Madder, E. Haubruge, B. Losson and K. De Clercq, 2009. Bluetongue virus detection by real-time RT-PCR in *Culicoides* captured during the 2006 epizootic in Belgium and development of an internal control. Transboundary and Emerging Diseases, 56(5): 170-177.
- Velthuis, A.G.J., H.W. Saatkamp, M.C.M. Mourits, A.A. de Koeijer and A.R.W. Elbers, 2010. Financial consequences of the Dutch bluetongue serotype 8 epidemics of 2006 and 2007. Preventive Veterinary Medicine, 93(4): 294-304.
- Venkatesan, M. and J.L. Rasgon, 2010. Population genetic data suggest a role for mosquito-mediated dispersal of West Nile virus across the western United States. Molecular Ecology, 19(8): 1573-1584.
- Venter, G.J., J.T. Paweska, H. Lunt, P.S. Mellor and S. Carpenter, 2005. An alternative method of blood-feeding *Culicoides imicola* and other haematophagous *Culicoides* species for vector competence studies. Veterinary Parasitology, 131(3-4): 331-335.
- Viennet, E., C. Garros, L. Gardes, I. Rakotoarivony, X. Allene, R. Lancelot, D. Crochet, C. Moulia, T. Baldet and T. Balenghien, submitted. Host preferences of Palaearctic *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae): implications for Orbivirus transmission. Medical and veterinary entomology.
- Viennet, E., C. Garros, I. Rakotoarivony, X. Allène, L. Gardes, J. Lhoir, I. Fuentes, R. Venail, D. R. Lancelot, M. Riou, C. Moulia, T. Baldet and T. Balenghien, submitted. Host-seeking activity of bluetongue virus vectors: endo/exophagy and circadian rhythm of *Culicoides* in Western Europe. Journal of Medical Entomology.
- Viennet, E., C. Garros, R. Lancelot, X. Allene, L. Gardes, I. Rakotoarivony, D. Crochet, J.-C. Delecalle, C. Moulia, T. Baldet and T. Balenghien, 2011. Assessment of vector/host contact: comparison of animal-baited traps and UV-light/suction trap for collecting *Culicoides* biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), vectors of Orbiviruses. Parasites & Vectors, 4(1): 119.
- Vinogradova, E.B., 2000. *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Sofia, Moscow: PENSOFT. pp: 250
- Votykka, J., P. Synek and M. Svobodova, 2009. Endophagy of biting midges attacking cavity-nesting birds. Medical and Veterinary Entomology, 23(3): 277-280.
- Waage, J.K., 1979. The evolution of insect/vertebrate associations. Biological Journal of the Linnean Society, 12: 187-224.
- Walker, A.R., 1977. Seasonal fluctuations of *Culicoides* species (Diptera: Ceratopogonidae) in Kenya. Bulletin of Entomological Research, 67: 217-233.
- Walker, A.R. and P.F.L. Boreham, 1976. Blood feeding of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Kenya in relation of the epidemiology of bluetongue and ephemeral fever. Bulletin of Entomological Research, 66: 181-188.
- Walton, T.E., 2004. The history of bluetongue and a current global overview Veterinaria Italiana, 40(3): 31-38.

- Ward, M.A. and N.R.H. Burgess, 1993. *Aedes albopictus* - A new disease vector for Europe? Journal of the Royal Army Medical Corps, 139: 109-111.
- Warnes, M.L. and L.H. Finlayson, 1987. Effect of host behaviour on host preference in *Stomoxys calcitrans* Medical and Veterinary Entomology, 1: 53-57.
- Washino, R.K. and C.H. Tempelis, 1983. Mosquito host bloodmeal identification -Methodology and data analysis. Annual Review of Entomology, 28: 179-201.
- Wigglesworth, V.B., 1941. The sensory physiology of the human louse *Pediculus humanus corporis* de Geer (Anoplura). Parasitology, 33(01): 67-109.
- Wilson, A.J. and P.S. Mellor, 2009. Bluetongue in Europe: past, present and future. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 364: 2669-2681.
- Yeruham, I., Y. Braverman and U. Orgad, 1993. Field observations in Israel on hypersensitivity in cattle, sheep and donkeys caused by *Culicoides*. Australian Veterinary Journal, 70(9): 348-352.
- Zimmer, J.-Y., C. Saegerman, B. Losson and E. Haubruge, 2010. Breeding sites of bluetongue virus vectors, Belgium [letter]. Emerging Infectious Disease, 16(3): 575-576.
- Zimmerman, R.H., S.J. Barker and E.C. Turner, 1982. Swarming and mating behavior of a natural population of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). Journal of Medical Entomology, 19(2): 151-156.

Insectes et maladies émergentes : contacts hôte/*Culicoides* en région paléarctique et leurs implications dans la transmission de la fièvre catarrhale ovine

La découverte du rôle des insectes en tant que vecteurs de pathogènes, établi depuis plus d'un siècle, a été l'élément moteur de la discipline « entomologie médicale et vétérinaire ». Malgré le succès de nombreuses campagnes de prévention et de programmes de lutte, nous assistons depuis une trentaine d'années à l'émergence et à la recrudescence de maladies à transmission vectorielle. Le virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) (Reoviridae : *Orbivirus*) est un très bon exemple de virus émergent en Europe dont les mécanismes de transmission sont encore peu connus dans cette région. Ce virus est transmis par des moucheron hématophages du genre *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) aux ruminants sauvages et domestiques. En Europe, la FCO a été pendant longtemps considérée comme une maladie exotique. À partir de 1998, plusieurs incursions apparaissent dans l'ouest du bassin méditerranéen en lien avec la remontée vers le nord de populations de *Culicoides imicola*, le principal vecteur afrotropical. À partir d'août 2006, l'apparition et la transmission du sérotype 8 dans le nord de l'Europe dans des zones où *C. imicola* est absent, révèle l'importance des espèces autochtones et la nécessité de comprendre leur rôle vecteur. Ce travail s'intéresse aux mécanismes de transmission du virus de la FCO en Europe non méditerranéenne, i) en présentant un état de l'art de la biologie et l'écologie des *Culicoides* adultes, ii) en évaluant les conditions possibles d'utilisation de pièges pour estimer le taux de piqure et iii) en décrivant les comportements trophiques pour les espèces d'intérêt vétérinaire.

Mots clés : *Culicoides*, fièvre catarrhale ovine, contact hôte/vecteur, comportement trophique, Europe

Insects and emerging diseases: host/*Culicoides* contacts in the Palaearctic region and their implications in bluetongue transmission

The discovery of insects as pathogens vectors was established for over a century and was the driving force behind the discipline "medical and veterinary entomology". Despite the success of some prevention and control program campaigns, the emergence and spread of vector-borne diseases occurred dramatically during this last thirty years. Bluetongue virus (BTV) (Reoviridae: *Orbivirus*) is a good example of emerging virus in Europe, with a little understanding of the epidemiology of this disease. This virus is transmitted by blood-sucking midges of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) to wild and domestic ruminants. In Europe, BT was considered an exotic disease. In 1998, several incursions appeared in the western Mediterranean Basin in line with the northward progression of *C. imicola* populations, the main afrotropical vector. From August 2006, the emergence and transmission of serotype 8 in northern Europe, in areas where *C. imicola* is absent, revealed the importance of autochthonous species and the urgent need to understand their role as vector. This work gives new insights into the understanding of BTV transmission in northern Europe: i) presenting a state of the art review of the biology and ecology of *Culicoides* adults, ii) assessing different methods to study the biting rate and iii) highlighting trends in host-seeking behavior.

Key words: *Culicoides*, bluetongue, host/vector contact, host-seeking behavior, Europe

Discipline: Microbiologie/Parasitologie

Intitulé et adresse du laboratoire de recherche

Cirad, UMR Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes
Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France